

# UNIVERSITÀ DI PAVIA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

Coordinatore: Prof. Stefano Perlini

Analisi sperimentale sull'efficacia clinica dell'ozono nel trattamento di  
patologie parodontali o perimplantari e valutazione *in vitro* come agente  
sbiancante.

Relatore:

Prof. Andrea Scribante

Tesi Sperimentale di Dottorato di

Simone Gallo

Matr. N° 495390

Anno Accademico 2022/2023

*Ai miei nonni.*

# INDICE

## RIASSUNTO

### 1. INTRODUZIONE

#### 1.1 La malattia parodontale

##### 1.1.1. Definizione clinica della parodontite

##### 1.1.2. Definizione di paziente come caso di parodontite

#### 1.2. La nuova classificazione delle malattie e condizioni parodontali e perimplantari (2017)

##### 1.2.1. Identificazione della forma di parodontite

##### 1.2.2. Ulteriori elementi proposti per l'inclusione nella classificazione della parodontite

##### 1.2.3. *Staging* e *grading* della malattia parodontale

##### 1.2.4. Stadio di parodontite

##### 1.2.5. Grado di parodontite

#### 1.3. Le patologie perimplantari

#### 1.4. L'ozonoterapia

##### 1.4.1. Cenni storici

##### 1.4.2. Meccanismi di azione

##### 1.4.3. Tossicità

##### 1.4.4. Controindicazioni

##### 1.4.5. Modalità di somministrazione

##### 1.4.6. Applicazioni dell'ozonoterapia in odontoiatria

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**

## **3. MATERIALI E METODI**

- 3.1. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della malattia parodontale
- 3.2. Studio per la valutazione dell'efficacia del gas ozonizzato rispetto alla fotomodulazione nel trattamento della malattia parodontale
- 3.3. Studio per la valutazione dell'efficacia di acqua ozonizzata nel trattamento della mucosite perimplantare
- 3.4. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della mucosite perimplantare
- 3.5. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nello sbiancamento di resine dentali composite pigmentate con clorexidina

## **4. RISULTATI**

- 4.1. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della malattia parodontale
- 4.2. Studio per la valutazione dell'efficacia del gas ozonizzato rispetto alla fotomodulazione nel trattamento della malattia parodontale
- 4.3. Studio per la valutazione dell'efficacia di acqua ozonizzata nel trattamento della mucosite perimplantare
- 4.4. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della mucosite perimplantare
- 4.5. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nello sbiancamento di resine dentali composite pigmentate con clorexidina

## **5. DISCUSSIONE**

## **6. CONCLUSIONI**

## **7. BIBLIOGRAFIA**

## **RINGRAZIAMENTI**

## RIASSUNTO

La cavità orale rappresenta un ecosistema aperto, sede di un equilibrio dinamico tra i microrganismi e l'ospite. Al fine di aumentare la propria sopravvivenza all'interno della bocca, i batteri tendono ad aderire alle superfici, nello specifico alle mucose e agli elementi dentali. La formazione e lo sviluppo del biofilm batterico è correlato alle più diffuse patologie orali, in particolare alla carie e alle patologie parodontali e perimplantari. La rimozione meccanica del biofilm e l'utilizzo di sistemi antimicrobici adjuvanti costituiscono la metodica di elezione per la prevenzione e il trattamento di tali patologie. L'obiettivo di questo studio, articolato in differenti filoni di ricerca, è stato quello di valutare l'efficacia di varie forme di ozonoterapia nel trattamento della malattia parodontale e della mucosite perimplantare. In aggiunta a ciò, è stato valutato il possibile impiego dell'ozono come agente sbiancante nei confronti delle resine composite dentali, vista l'assenza ad oggi di studi pubblicati in letteratura su tale tematica.

I risultati di questo lavoro mostrano come l'ozono, somministrato sotto forma di gel ozonizzato, gas ozonizzato e acqua ozonizzata, mostri un'efficacia comparabile e talvolta superiore ad altre sostanze antimicrobiche di comune utilizzo in odontoiatria, in assenza degli effetti collaterali tipicamente associati a queste ultime. Analogamente, l'ozono somministrato in forma di gel ozonizzato si è rivelato efficace nel comportare una variazione colorimetrica delle resine composite ad uso dentale.

Sulla base di tali risultati, si evince come l'ozonoterapia rappresenti un'arma efficace in odontoiatria sia per il trattamento di patologie gengivali infiammatorie sia come agente sbiancante, evitando inoltre gli effetti collaterali delle altre sostanze convenzionalmente utilizzate per i medesimi scopi.

## **1. INTRODUZIONE**

## 1.1 LA MALATTIA PARODONTALE

La malattia parodontale, o parodontite, è un'inflammatione ad eziologia microbica, mediata dall'ospite, che interessa i tessuti di supporto del dente comportando la perdita dell'attacco parodontale. La patogenesi della malattia parodontale è stata definita nelle sue principali vie molecolari ed è caratterizzata, in ultima analisi, dall'attivazione di proteinasi derivate dall'ospite a seguito dell'insulto microbico (corrispondente al *biofilm* batterico) con conseguente perdita delle fibre legamentose marginali del legamento parodontale, migrazione apicale dell'epitelio giunzionale, e ulteriore diffusione apicale del biofilm batterico lungo la superficie della radice [Kinane et al., 2017]. Sebbene la formazione del biofilm batterico rappresenti il fattore chiave per l'inizio e la progressione dell'inflammatione parodontale, è stato dimostrato che la patologia parodontale ricade nelle patologie ad eziologia multifattoriale in cui fattori biologici, genetici, ambientali e comportamentali concorrono alla patogenesi della malattia. Tra questi ultimi, grande attenzione è stata posta sul fumo, ampiamente riconosciuto come fattore favorente l'insorgenza e la progressione della patologia parodontale. Allo stesso modo, è stato dimostrato come patologie sistemiche, in particolare il diabete, possano favorire l'insorgenza dell'inflammatione cronica dei tessuti di supporto del dente, oltre a mostrare esse stesse un decorso clinico direttamente correlato al controllo dell'inflammatione gengivale [Preshaw and Bissett, 2019].

La presentazione clinica della parodontite differisce in base all'età del paziente e al numero di lesioni, alla distribuzione, alla gravità e alla sede all'interno dell'arcata dentale. Negli ultimi decenni, i tentativi di classificare le differenti forme di parodontiti si sono concentrati su un dilemma rappresentato dal fatto che le presentazioni

fenotipiche possono rappresentare patologie sottostanti differenti oppure essere variazioni di una singola malattia. Tale difficoltà è dimostrata dalle modifiche al sistema di classificazione che hanno progressivamente enfatizzato le differenze o i punti in comune tra varie forme di patologie gengivali [Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Princeton, New Jersey, July 23–27, 1989]. Poco prima del Workshop Internazionale sulla classificazione delle malattie parodontali del 1999, la ricerca sul campo ha messo in evidenza le caratteristiche individuali della parodontite e quindi le differenze di fenotipo. Queste sono emerse dall'identificazione di specifici batteri o complessi batterici come agenti eziologici della parodontite [Socransky et al., 1998], dal riconoscimento dell'esistenza di molteplici fattori di rischio modificabili [Papapanou, 1996], e dall'identificazione della rilevanza della suscettibilità genetica [Michalowicz et al., 1991] e dei polimorfismi specifici associati alla gravità della malattia [Michalowicz et al., 2000].

Sulla base di tali aspetti, la classificazione proposta nel 1999 ha portato al riconoscimento delle seguenti quattro diverse forme di parodontite: parodontite necrotizzante, parodontite cronica, parodontite aggressiva, parodontite come manifestazione di malattie sistemiche. Tale sistema di classificazione mirava a differenziare le forme più comuni di parodontite, vale a dire parodontite cronica e aggressiva, dalla forma insolita necrotizzante della malattia (caratterizzata da una fisiopatologia e presentazione clinica unica e da trattamento terapeutico distinto), e dalle forme di patologie parodontali associate a rari difetti genetici o carenze acquisite nei componenti della difesa.

Il rapporto di consenso del gruppo del 1999 sulla parodontite aggressiva ha individuato le caratteristiche specifiche di questa forma di malattia e ha proposto l'esistenza di



criteri maggiori e minori per la definizione dei casi e di caratteristiche distributive per differenziare le forme localizzate da quelle generalizzate di parodontite [Lang et al., 1999]. I casi di parodontite che non soddisfano la definizione del fenotipo "aggressivo" sarebbero classificati come "cronici" con l'implicazione che questi ultimi casi potrebbero essere gestiti più facilmente e, con una terapia e una cura di mantenimento appropriate, raramente comprometterebbero il mantenimento di una dentizione funzionale [Lindhe et al., 1999]. La logica della differenziazione tra parodontite cronica e aggressiva comprendeva la capacità di identificare e focalizzare l'attenzione sui casi più problematici: sviluppo di patologia parodontale a maggiore gravità in una fase precoce della vita, a più alto rischio di progressione e/o con necessità di approcci terapeutici specifici.

Il Workshop Internazionale sulla classificazione delle malattie parodontali del 1999 ha affrontato una serie di problematiche relative all'applicabilità clinica e al razionale fisiopatologico dei precedenti sistemi di classificazione [American Academy of Periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions], sottolineando la necessità di cogliere le differenze tra forme della malattia in grado di portare all'edentulismo, ma non comunicando chiaramente le differenze tra parodontite cronica e aggressiva. Mentre il rapporto di consenso del gruppo di lavoro sulla parodontite aggressiva si articolava in criteri maggiori e minori richiesti per la diagnosi di parodontite aggressiva, nonché definizioni specifiche per identificare i modelli di distribuzione delle lesioni all'interno della dentizione, la difficoltà di applicare i criteri stabiliti nella pratica clinica quotidiana e la sostanziale sovrapposizione tra le categorie diagnostiche hanno costituito una barriera per i clinici nell'applicazione del sistema di classificazione. Inoltre, la validità di molti dei criteri

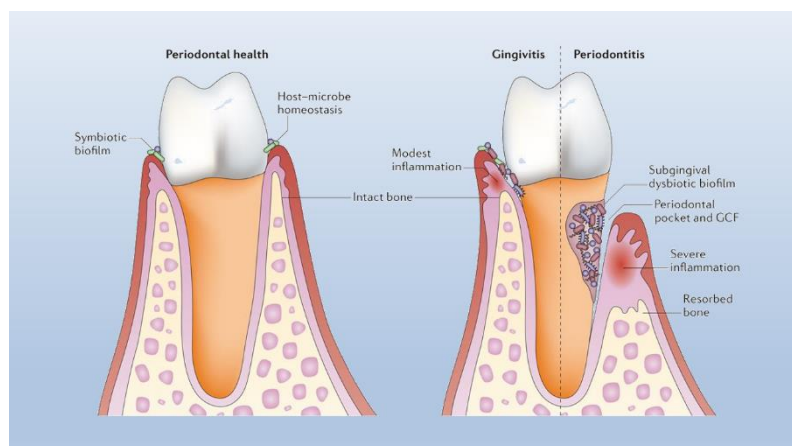
per la parodontite aggressiva non è stata confermata in studi sufficientemente validi da un punto di vista metodologico. Negli ultimi due decenni, i clinici, i ricercatori e gli epidemiologi hanno espresso la loro preoccupazione per la loro capacità di differenziare i casi di parodontite aggressiva da quelli di parodontite cronica, e queste difficoltà sono state una delle ragioni principali per un successivo workshop di classificazione [Tonetti et al., 2018].

Nello specifico, gli studi condotti dai ricercatori hanno dimostrato che non esiste evidenza di una specifica ragione pato-fisiologica che permetta la distinzione di casi che, secondo la precedente classificazione, sarebbero classificati come casi di parodontite aggressiva e cronica. È pur vero, tuttavia, che specifici gruppi della popolazione mostrano diversi livelli di progressione della malattia come dimostrato da una maggior severità di perdita di attacco clinico. Comunque, un sistema di classificazione basato solamente sulla severità di malattia non è in grado di sottolineare aspetti importanti della malattia di un individuo, come la complessità che influenza l'approccio terapeutico, i fattori di rischio che influenzano l'outcome terapeutico, e il livello di conoscenza necessario per la gestione del caso individuale.

### **1.1.1 Definizione clinica della parodontite**

A differenza della gengivite, definita come infiammazione reversibile del tessuto parodontale, la parodontite è caratterizzata da un'infiammazione microbica, mediata dall'ospite, che provoca la perdita irreversibile dell'attacco parodontale [Kinane et al., 2017] Quest'ultima viene rilevata come perdita del livello di attacco clinico (CAL, *clinical attachment level*), attraverso la valutazione circonferenziale della dentizione

erotta con una sonda parodontale standardizzata prendendo come riferimento la giunzione cemento-smalto (CEJ, *cemento-enamel junction*) [Barbosa et al., 2016]. Altri segni correlati alla perdita irreversibile di attacco parodontale sono rappresentati clinicamente dalla formazione di tasche parodontali e/o di recessioni gengivali oltre che dal riassorbimento osseo visibile tramite indagine radiografica (Figure 1-3) [Tugnait and Carmichael, 2005].



**Fig. 1.** Schema rappresentativo della differenza tra tessuto parodontale nelle seguenti condizioni: tessuto sano, presenza di gengivite, presenza di parodontite [Justus et al., 2015].



**Fig. 2.** Recessione gengivale con contestuale profondità di sondaggio aumentata.



**Fig. 3.** Perdita di osso alveolare localizzata.

Un sistema di definizione dei casi di parodontite dovrebbe facilitare l'identificazione, il trattamento e la prevenzione della parodontite nel singolo paziente. Nello specifico, tale sistema dovrebbe includere tre componenti [Tonetti et al., 2018]:

1. identificazione di un paziente come caso di parodontite;
2. identificazione della forma specifica di parodontite;
3. descrizione della presentazione clinica e di altri elementi che influenzano la gestione clinica, la prognosi e, potenzialmente, influiscono sulla salute sia orale che sistemica.

Inoltre, le definizioni dei casi possono essere applicate in diversi contesti: cura del paziente, indagini epidemiologiche, ricerche su meccanismi di malattia o risultati terapeutici. Nei vari contesti, le definizioni dei casi possono richiedere una diversa diagnostica, in base agli obiettivi della specifica applicazione. Un sistema di definizione del caso deve essere quindi un processo dinamico che richiederà revisioni nel tempo e dovrebbe risultare [Tonetti et al., 2018]:

- abbastanza semplice da essere clinicamente applicabile, ma non semplicistico;

- standardizzato per essere in grado di supportare una comunicazione efficace tra tutte le parti interessate;
- accessibile a una vasta gamma di persone e comprensibile da membri del team di assistenza sanitaria orale in tutto il mondo.

Si suggerisce di adottare una definizione del caso basata su una matrice di stadio di parodontite e grado di parodontite. Tale visione multidimensionale della parodontite creerebbe il potenziale per trasformare la nostra visione della parodontite, e garantirebbe la capacità di comunicare al meglio con i pazienti, con altri professionisti e con terzi.

### **1.1.2 Definizione di paziente come caso di parodontite**

Considerato l'errore di misura del livello di attacco clinico con una sonda parodontale standard, un grado di errata classificazione della fase iniziale della parodontite è inevitabile e questo influisce sulla precisione diagnostica. Con l'aumento della gravità della malattia, il CAL (*clinical attachment loss*) è più consolidato e un caso di parodontite può essere identificato con maggiore accuratezza. È necessario quindi tenere in considerazione che fino a quando non saranno validati metodi più robusti, come biomarcatori salivari o nuove tecnologie di imaging per i tessuti molli, il livello di esperienza con il sondaggio parodontale influenzerà notevolmente l'identificazione di un caso di parodontite [Eke et al., 2012]. Va notato che l'infiammazione parodontale, in genere misurata come sanguinamento al sondaggio (BOP, *bleeding on probing*), è un importante parametro clinico relativo alla valutazione degli esiti del trattamento della parodontite e del rischio residuo di malattia post- trattamento [Tonetti and Claffey,

2005]. Tuttavia, il BOP (*bleeding on probing*), da solo o come parametro secondario alla perdita di attacco clinico, non modifica la definizione iniziale del caso come definito da CAL (*clinical attachment loss*) né cambia la classificazione della gravità della parodontite [Tonetti et al., 2018].

Negli ultimi anni sono state proposte differenti definizioni per i casi di parodontite. In particolare, sono state ampiamente utilizzate la definizione dei casi proposta da AAP/Centers for Disease Control (CDC) per la sorveglianza epidemiologica e la definizione dei casi proposta da EFP ai fini della ricerca sui fattori di rischio [Eke et al., 2012]. Sebbene queste definizioni condividano i principali aspetti, vi sono alcune importanti differenze.

Sulla base di questa considerazione, nel contesto del *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions* del 2017 è stato suggerito di adottare un'unica definizione [Tonetti et al., 2018]. Un paziente è considerato un caso di parodontite nel contesto delle cure cliniche qualora si verifichi una delle due seguenti condizioni:

- perdita di attacco clinico (CAL) (*clinical attachment loss*) interdentale rilevabile su due o più denti non adiacenti;
- perdita di attacco clinico vestibolare maggiore o uguale a 3 mm con sondaggio superiore a 3 mm rilevabile su due o più denti.

In aggiunta ciò, la definizione di un caso di parodontite può avvenire qualora la perdita di attacco clinico (CAL) non sia riconducibile alle seguenti altre cause eziologiche [Tonetti et al., 2018]:

- recessione gengivale di origine traumatica;
- carie dentale estesa nella zona cervicale del dente;

- presenza di perdita di attacco clinico (CAL) sull'aspetto distale di un secondo molare e associata alla malposizione o all'estrazione di un terzo molare;
- presenza di una lesione endodontica drenante attraverso il parodonto marginale;
- verificarsi di una frattura verticale della radice.

L'aspetto chiave per la definizione del caso di parodontite è il concetto di perdita di attacco clinico (CAL) interdentale "rilevabile" che si basa sulla possibilità per il clinico di identificare specificamente aree di perdita di attacco durante il sondaggio o la visualizzazione diretta della linea amelo-cementizia (CEJ) durante l'ispezione clinica, tenendo in conto possibili errori di misura e fattori locali. È necessario considerare che la rilevazione della perdita di attacco è influenzata dalle capacità dell'operatore (specialista o generalista) e da fattori locali che possono facilitare o rendere difficile la rilevazione della linea amelo-cementizia (CEJ), tra cui la posizione del margine gengivale rispetto la CEJ, la presenza di calcoli o di margini restaurativi. La definizione proposta di caso di parodontite non prevede una soglia specifica di CAL (*clinical attachment loss*) rilevabile per evitare l'errata classificazione dei casi di parodontite iniziale come gengivite e mantenere la coerenza delle definizioni istologiche e cliniche. C'è anche una necessità di aumentare la specificità della definizione e questo viene realizzato rilevando la perdita di attacco su due denti non adiacenti [Tonetti et al., 2018].

A seguito della definizione di caso di parodontite, la *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions* del 2017 è passata a definire le possibili forme di parodontite sulla base della fisiopatologia.

## 1.2 LA NUOVA CLASSIFICAZIONE DELLE MALATTIE E CONDIZIONI PARODONTALI E PERIMPLANTARI (2017)

La nuova classificazione proposta nel 2017 (*Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions*) (tabella 1) prevede la distinzione delle tre seguenti malattie e condizioni che possono interessare i tessuti parodontali [Caton et al., 2018]:

1. Salute parodontale, Patologie e condizioni gengivali (tabella 2);
2. Parodontite (tabella 3);
3. Altre condizioni che interessano i tessuti parodontali (tabella 4).

**Tab.1.** Malattie e condizioni parodontali [Caton et al., 2018].

Periodontal Diseases and Conditions										
Periodontal Health, Gingival Diseases and Conditions			Periodontitis			Other Conditions Affecting the Periodontium				
Chapple, Mealey, et al. 2018 Consensus Rept <a href="#">link</a>			Papapanou, Sanz et al. 2018 Consensus Rept <a href="#">link</a>			Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept <a href="#">link</a>				
Trombelli et al. 2018 Case Definitions <a href="#">link</a>			Tonetti, Greenwell, Kornman. 2018 Case Definitions <a href="#">link</a>			Papapanou, Sanz et al. 2018 Consensus Rept <a href="#">link</a>				
Periodontal Health and Gingival Health	Gingivitis: Dental Biofilm-Induced	Gingival Diseases: Non-Dental Biofilm-Induced	Necrotizing Periodontal Diseases	Periodontitis	Periodontitis as a Manifestation of Systemic Disease	Systemic diseases or conditions affecting the periodontal supporting tissues	Periodontal Abscesses and Endodontic-Periodontal Lesions	Mucogingival Deformities and Conditions	Traumatic Occlusal Forces	Tooth and Prosthesis Related Factors



**Tab.2.** Salute parodontale, malattie e condizioni gengivali [Caton et al., 2018].

<b>PERIODONTAL HEALTH, GINGIVAL DISEASES/CONDITIONS</b>	
<b>1. Periodontal health and gingival health</b>	
	Lang & Bartold 2018 <a href="#">link</a>
a.	Clinical gingival health on an intact periodontium
b.	Clinical gingival health on a reduced periodontium
i.	Stable periodontitis patient
ii.	Non-periodontitis patient
<b>2. Gingivitis – dental biofilm-induced</b>	
	Murakami et al. 2018 <a href="#">link</a>
a.	Associated with dental biofilm alone
b.	Mediated by systemic or local risk factors
c.	Drug-influenced gingival enlargement
<b>3. Gingival diseases – non-dental biofilm induced</b>	
	Holmstrup et al. 2018 <a href="#">link</a>
a.	Genetic/developmental disorders
b.	Specific infections
c.	Inflammatory and immune conditions
d.	Reactive processes
e.	Neoplasms
f.	Endocrine, nutritional & metabolic diseases
g.	Traumatic lesions
h.	Gingival pigmentation

**Tab.3.** Forme di parodontite [Caton et al., 2018].

## FORMS OF PERIODONTITIS

### 1. Necrotizing Periodontal Diseases

Herrera et al. 2018 [link](#)

- a. Necrotizing Gingivitis
- b. Necrotizing Periodontitis
- c. Necrotizing Stomatitis

### 2. Periodontitis as Manifestation of Systemic Diseases

Jepsen, Caton et al. 2018 Consensus Rept [link](#)

Albandar et al. 2018 [link](#)

*Classification of these conditions should be based on the primary systemic disease according to the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD) codes*

### 3. Periodontitis

Fine et al. 2018 [link](#)

Needleman et al. 2018 [link](#)

Billings et al. 2018 [link](#)

- a. **Stages:** Based on Severity<sup>1</sup> and Complexity of Management<sup>2</sup>
  - Stage I: Initial Periodontitis
  - Stage II: Moderate Periodontitis
  - Stage III: Severe Periodontitis with potential for additional tooth loss
  - Stage IV: Severe Periodontitis with potential for loss of the dentition
- b. Extent and distribution<sup>3</sup>: localized; generalized; molar-incisor distribution
- c. **Grades:** Evidence or risk of rapid progression<sup>4</sup>, anticipated treatment response<sup>5</sup>
  - i. Grade A: Slow rate of progression
  - ii. Grade B: Moderate rate of progression
  - iii. Grade C: Rapid rate of progression

**Tab. 4.** Manifestazioni parodontali di malattie sistemiche e condizioni di sviluppo e acquisite [Caton et al., 2018].

## PERIODONTAL MANIFESTATIONS OF SYSTEMIC DISEASES AND DEVELOPMENTAL AND ACQUIRED CONDITIONS

### 1. Systemic diseases or conditions affecting the periodontal supporting tissues

Albandar et al. 2018 [link](#)

### 2. Other Periodontal Conditions

Papapanou, Sanz et al. 2018 [link](#)

Herrera et al. 2018 [link](#)

- a. Periodontal Abscesses
- b. Endodontic-Periodontal Lesions

### 3. Mucogingival deformities and conditions around teeth

Cortellini & Bissada 2018 [link](#)

- a. Gingival phenotype
- b. Gingival/soft tissue recession
- c. Lack of gingiva
- d. Decreased vestibular depth
- e. Aberrant frenum/muscle position
- f. Gingival excess
- g. Abnormal color
- h. Condition of the exposed root surface

### 4. Traumatic occlusal forces

Fan & Caton 2018 [link](#)

- a. Primary occlusal trauma
- b. Secondary occlusal trauma
- c. Orthodontic forces

### 5. Prostheses and tooth-related factors that modify or predispose to plaque-induced gingival diseases/periodontitis

Ercoli & Caton 2018 [link](#)

- a. Localized tooth-related factors
- b. Localized dental prostheses-related factors

### **1.2.1. Identificazione della forma di parodontite**

Sulla base della fisiopatologia, la classificazione proposta dal *World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions* del 2017 prevede la distinzione di tre forme di parodontite [Tonetti et al., 2018]:

1. Malattie parodontali necrotizzanti;
2. Parodontite come manifestazione diretta di malattie sistemiche;
3. Parodontite.

La diagnosi differenziale tra queste forme si basa sull'anamnesi e sui segni e sintomi specifici della parodontite necrotizzante e sulla presenza o meno di una malattia sistemica in grado di alterare definitivamente la risposta immunitaria dell'ospite. La parodontite necrotizzante è caratterizzata da storia di dolore, presenza di ulcerazione del margine gengivale e/o depositi di fibrina in corrispondenza di papille gengivali tipicamente decapitate e, in alcuni casi, dall'esposizione dell'osso alveolare marginale [Okubo et al., 2022].

Per quanto riguarda la parodontite come manifestazione diretta di malattia sistemica, la raccomandazione fornita è di seguire la classificazione della malattia primaria secondo i rispettivi codici ICD (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) [Arigbede et al., 2012].

La stragrande maggioranza dei casi clinici di parodontite, che ricadono nel terzo gruppo della classificazione, non ha le caratteristiche locali della parodontite necrotizzante o le caratteristiche sistemiche di un raro disturbo immunitario con una manifestazione secondaria di parodontite [Tonetti et al., 2018].

### **1.2.2. Ulteriori elementi proposti per l'inclusione nella classificazione della parodontite**

A partire dal Workshop Internazionale di Classificazione del 1999 è diventato evidente che, oltre alla forma specifica di parodontite e alla gravità e all'entità della distruzione parodontale, sono necessarie informazioni aggiuntive per caratterizzare in modo più specifico l'impatto della malattia sulla dentizione di un singolo paziente e sugli approcci terapeutici necessari per gestire il caso. La diagnosi clinica deve quindi essere onnicomprensiva nell'esprimere gli effetti della parodontite e deve tener conto non solo degli effetti della malattia a livello del cavo orale, ma anche delle potenziali implicazioni sistemiche. Gli aspetti della patologia di cui è necessario tenere conto sono quindi i seguenti:

- **Gravità**

Il grado di distruzione parodontale presente alla diagnosi è stato a lungo utilizzato come descrittore chiave del singolo caso di parodontite. Il sistema di definizione dei casi del 1999 si basa anche sulla gravità. La logica della classificazione in base alla gravità comprende almeno due importanti aspetti: la complessità della gestione e l'estensione della malattia. Importanti limitazioni delle definizioni di gravità meritano di essere discusse anche nel contesto dei recenti miglioramenti terapeutici che hanno permesso una gestione di successo delle parodontiti progressivamente più gravi. Le definizioni convenzionali di parodontite grave devono essere riviste per discriminare meglio le forme più gravi di parodontite. Un'altra importante limitazione delle precedenti definizioni di parodontite grave è un paradosso: ogni volta che i denti più colpiti nella dentizione vengono persi, la gravità può effettivamente diminuire. La perdita di denti

attribuibile alla parodontite deve quindi essere incorporata nella definizione di gravità [Cortellini et al., 2011].

- **Complessità di trattamento**

Fattori come la profondità di sondaggio, il tipo di perdita ossea (verticale e/o orizzontale), lo stato delle forcazioni, la mobilità dentale, la mancanza di elementi dentali, e la perdita di dimensione verticale aumentano la complessità del trattamento ed è quindi necessario che vengano considerate la classificazione diagnostica [Lindhe et al., 1984].

- **Estensione**

Il numero e la distribuzione di denti con compromissione parodontale sono già stati presi in considerazione nei sistemi di classificazione. Il numero di denti affetti è stato utilizzato per definire i casi di parodontite cronica secondo la classificazione del 1999 mentre la distribuzione delle lesioni (compromissione parodontale a livello di molari/incisivi o generalizzata) è stata utilizzata per definire la parodontite aggressiva [Armitage, 1999].

- **Velocità di progressione**

Uno degli aspetti più importanti per un sistema di classificazione è definire la variabilità nella velocità di progressione della parodontite. L'importanza di questo criterio è stata ben riconosciuta già nella classificazione AAP del 1989 che ha identificato una forma di parodontite a rapida progressione. Il principale limite di tale criterio è stato definire

le modalità per rilevare la velocità di progressione alla valutazione iniziale in assenza di evidenza diretta (es. precedenti indagini radiologiche che permettano il confronto della perdita di osso marginale nel tempo) [Paraskevas et al., 2008].

- **Fattori di rischio**

I fattori di rischio noti non sono stati precedentemente inclusi formalmente nella classificazione della parodontite ma sono stati utilizzati come descrittori per qualificare il paziente come fumatore o diabetico. L'incremento della conoscenza su come i fattori di rischio influenzino la parodontite e la risposta al trattamento (maggior severità ad un'età più precoce e minor risposta alle procedure terapeutiche) indicano che i fattori di rischio dovrebbero essere considerati nella classificazione della parodontite [McGuire and Nunn, 1999].

- **Rapporto con la salute sistemica**

A partire dal workshop del 1999 un'evidenza sempre maggiore è emersa circa gli effetti della parodontite sulle malattie sistemiche. Differenti meccanismi sono stati proposti per relazionare la parodontite alle malattie sistemiche. È emerso che, ad esempio, specifici batteri orali nelle tasche parodontali sono in grado di raggiungere il circolo sanguigno attraverso l'epitelio ulcerato della tasca. I mediatori dell'infiammazione del parodonto sono in grado di entrare in circolo e attivare le proteine epatiche della fase acute, come la proteina C reattiva (PCR), le quali amplificano ulteriormente il livello di infiammazione sistemica. L'incremento dei livelli infiammatori può essere implicato nello sviluppo di patologia coronarica, infarto e diabete mellito di tipo II. L'evidenza attuale che un trattamento efficace di certi casi di parodontite possa influenzare le

patologie sistemiche, sebbene ad oggi limitata soprattutto al diabete mellito di tipo II, rappresenta un aspetto interesse per la comunità dei clinici e dei ricercatori [Sanz and Kornman, 2013].

### **1.2.3. Staging e grading della malattia parodontale**

Un aspetto mancante nei sistemi di classificazione della parodontite precedentemente proposti è rappresentato dalla precisa identificazione dei pazienti che verosimilmente necessiteranno di maggiori sforzi per prevenire o controllare a lungo termine la patologia parodontale. La maggior parte dei pazienti rispondono in maniera predicibile agli approcci convenzionali sia per la prevenzione che per il trattamento della patologia, mentre altri possono richiedere trattamenti preventivi o interventi terapeutici più intensivi o più frequenti [Tonetti et al., 2018].

La stadiazione (*staging*), ampiamente utilizzata in ambito oncologico, è stata recentemente proposta per la diagnosi delle patologie parodontali e permette di poter costruire una classificazione diagnostica multidimensionale non esclusivamente basata sulla distruzione parodontale pregressa. Pertanto, un sistema di stadiazione dovrebbe fornire il modo per definire lo stato della parodontite in vari momenti nel tempo, dovrebbe poter essere facilmente comunicata ad altri operatori e dovrebbe rappresentare un fattore nella valutazione prognostica. La stadiazione si basa quindi sugli aspetti della severità e dell'estensione della parodontite ma introduce inoltre la dimensione della complessità nella gestione terapeutica del paziente individuale [Tonetti et al., 2017].

Poiché è noto che individui con severità/estensione di malattia differenti e differente complessità possono presentare differenti velocità di progressione della patologia e/o fattori di rischio, l'informazione derivante dalla stadiazione della parodontite dovrebbe



essere supplementata da informazioni relative al grado biologico della malattia. In particolare, i parametri di cui tenere conto sono tre: la velocità di progressione della parodontite, la presenza di fattori di rischio noti per la progressione della parodontite e il rischio di influenza sulla salute sistemica. Analogamente all'ambito oncologico, per supplementare la stadiazione che fornisce una sintesi della presentazione clinica della patologia, il ricorso al *grading* si rende necessario per specificare la potenzialità per la patologia di progredire (Tabella 5) [Tonetti et al., 2018].

**Tab. 5.** Obiettivi del sistema di staging e grading nel paziente parodontale.

	<b>OBIETTIVI</b>
<b>STAGING</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Classificare la severità e l'estensione</b> della parodontite sulla base dell'estensione di danno e distruzione tissutale attribuibile alla parodontite;</li> <li>• <b>Valutare la complessità</b> determinando la presenza di eventuali fattori in grado di rendere complesso il controllo attuale della patologia e la gestione a lungo termine dell'alterazione funzionale ed estetica.</li> </ul>
<b>GRADING</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Stimare il rischio futuro di progressione di parodontite e risposta agli standard terapeutici per guidare l'intensità della terapia e il monitoraggio;</b></li> <li>• <b>Stimare il potenziale impatto della parodontite</b> sulla salute sistemica, guidare il monitoraggio sistemico in unione ad altri professionisti sanitari.</li> </ul>

#### **1.2.4. Stadio di parodontite**

Sulla base di tali considerazioni, la classificazione delle malattie parodontali proposta nel 2017 prevede la distinzione della patologia in quattro stadi, ciascuno definito da una presentazione unica in termini di severità di malattia e complessità di trattamento [Tonetti et al., 2018].

##### **1) Parodontite di stadio I**

La parodontite stadio I rappresenta la terra di confine tra gengivite e parodontite e costituisce la prima fase della perdita di attacco. Come tale, i pazienti con parodontite di stadio I hanno sviluppato la parodontite in risposta alla persistenza dell'infiammazione gengivale e della disbiosi del biofilm. Essi rappresentano più di una semplice diagnosi precoce: se mostrano un grado di perdita di attacco clinico ad un livello relativamente basso in giovane età, questi pazienti possono aver aumentata la suscettibilità all'insorgenza della malattia. Diagnosi precoce e definizione di una popolazione di persone sensibili offrono l'opportunità di intervento precoce e il monitoraggio che può rivelarsi più conveniente a livello di popolazione, poiché le lesioni poco profonde possono fornire opzioni specifiche sia per la rimozione meccanica convenzionale del biofilm sia per gli agenti farmacologici forniti in ausili per l'igiene orale. La diagnosi precoce può essere una sfida formidabile nella pratica odontoiatrica generale: l'indagine parodontale per stimare la perdita di attacco clinico precoce - l'attuale *gold standard* per la definizione di parodontite – può tuttavia essere imprecisa. Valutazione di biomarcatori salivari e/o nuove immagini e tecnologie possono aumentare la diagnosi precoce della parodontite di stadio I in una varietà di

condizioni.

## **2) Parodontite di stadio II**

Lo stadio II rappresenta una parodontite accertata in cui un esame clinico parodontale eseguito con cura identifica i danni caratteristici che la parodontite ha causato al supporto del dente. In questa fase del processo di malattia, tuttavia, la gestione rimane relativamente semplice per molti casi, in quanto l'applicazione di principi di trattamento standard che prevedono una regolare rimozione batterica domiciliare e professionale, e il monitoraggio dovrebbero arrestare la progressione della malattia. È necessario prestare attenzione alla valutazione della risposta del paziente di stadio II al trattamento standard in quanto il grado di risposta al trattamento può guidare una gestione più intensiva per pazienti specifici.

## **3) Parodontite di stadio III**

Nello stadio III, la parodontite ha prodotto danni significativi all'apparato di attacco e, in assenza di un trattamento avanzato, può verificarsi la perdita degli elementi dentali. Questo stadio è caratterizzato dalla presenza di profonde lesioni parodontali che si estendono alla porzione centrale della radice e la cui gestione è complicata dalla presenza di profondi difetti infraossei, dal coinvolgimento della forcazione, dalla storia di perdita/esfoliazione dei denti parodontali e dalla presenza di difetti di cresta localizzati che complicano la sostituzione del dente con un impianto. Nonostante la possibilità di perdita dei denti, la funzione masticatoria è preservata e il trattamento della parodontite non richiede una complessa riabilitazione della funzione.

#### **4) Parodontite stadio IV**

Nello stadio più avanzato, la parodontite provoca notevoli danni al supporto parodontale e può causare una perdita significativa dei denti, che si traduce in una perdita della funzione masticatoria. In assenza di un adeguato controllo della parodontite e di una riabilitazione adeguata, la dentizione rischia di andare perduta. Questa fase è caratterizzata dalla presenza di profonde lesioni parodontali che si estendono alla porzione apicale della radice e/o storia di perdita dentale multipla; è spesso complicata dall'ipermobilità dentale dovuta a traumi oclusali secondari e al collasso del morso posteriore e spesso la gestione dei casi richiede la stabilizzazione/ripristino della funzione masticatoria.

Attualmente sono disponibili dati rilevanti per valutare le due dimensioni del processo di stadiazione: gravità e complessità. Questi possono essere valutati in ogni singolo caso al momento della diagnosi con dati anamnestici, clinici e di imaging appropriati. Il punteggio di gravità si basa principalmente sulla CAL (*clinical attachment level*) interdentale in riconoscimento della bassa specificità sia della profondità di tasca sia della perdita di osso marginale, sebbene la perdita di osso marginale sia anche inclusa come descrittore aggiuntivo [Tonetti et al., 2018]. Segue il quadro generale dei precedenti punteggi basati sulla gravità e viene assegnato in base al dente più gravemente colpito nella dentizione. Per il punteggio viene utilizzata solo la perdita di attacco attribuibile alla parodontite. Il punteggio di complessità si basa sulla complessità del trattamento locale e tiene conto di fattori quali la presenza di difetti verticali, il coinvolgimento della biforcazione, l'ipermobilità dei denti, la perdita dei denti, il deficit di cresta e la perdita della funzione masticatoria. Oltre alla complessità locale, si riconosce

che la gestione dei singoli casi può essere complicata da fattori medici o comorbidità. La classificazione diagnostica presentata nella Tabella 6 fornisce definizioni per i quattro stadi di parodontite. Nella suddetta tabella, è importante utilizzare CAL (*clinical attachment level*) come fattore determinante dello stadio iniziale nella dimensione della gravità. Si riconosce che nell'applicazione della pratica clinica alcuni medici possano preferire l'uso di immagini radiografiche di qualità diagnostica come valutazione indiretta e in qualche modo meno sensibile della distruzione parodontale [Tonetti et al., 2018].

Tutto ciò può rappresentare ciò che è necessario per stabilire lo stadio. Tuttavia, se sono presenti altri fattori nella dimensione della complessità che influenzano la malattia, può essere necessario modificare l'assegnazione dello stadio iniziale. I pazienti che sono stati trattati per la parodontite possono essere periodicamente rivisti per il *follow up*. Nella maggior parte dei pazienti trattati con successo, i fattori di complessità che potrebbero aver contribuito alla stadiazione di base saranno stati risolti attraverso il trattamento. In tali pazienti la CAL (*clinical attachment level*) e la perdita ossea radiografica (RBL, *radiography bone loss*) saranno i fattori determinanti dello stadio primario. Se uno o più fattori di complessità in grado di modificare lo stadio di parodontite è stato eliminato dal trattamento, lo stadio non dovrebbe retrocedere ad uno stadio inferiore, poiché il fattore di complessità dello stadio originale dovrebbe sempre essere considerato nella gestione della fase di mantenimento. Un'eccezione degna di nota è una riuscita rigenerazione parodontale che comporta il miglioramento del supporto dentale, dell'indice CAL (*clinical attachment level*) e RBL (*radiography bone loss*) del dente [Tonetti et al., 2018].

**Tab. 6.** I quattro stadi della malattia parodontale [Tonetti et al., 2018].

Periodontitis stage		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Severity	Interdental CAL at site of greatest loss	1 to 2 mm	3 to 4 mm	≥5 mm	≥5 mm
	Radiographic bone loss	Coronal third (<15%)	Coronal third (15% to 33%)	Extending to mid-third of root and beyond	Extending to mid-third of root and beyond
	Tooth loss	No tooth loss due to periodontitis		Tooth loss due to periodontitis of ≤4 teeth	Tooth loss due to periodontitis of ≥5 teeth
Complexity	Local	Maximum probing depth ≤4 mm Mostly horizontal bone loss	Maximum probing depth ≤5 mm Mostly horizontal bone loss	In addition to stage II complexity: Probing depth ≥6 mm Vertical bone loss ≥3 mm Furcation involvement Class II or III Moderate ridge defect	In addition to stage III complexity: Need for complex rehabilitation due to: Masticatory dysfunction Secondary occlusal trauma (tooth mobility degree ≥2) Severe ridge defect Bite collapse, drifting, flaring Less than 20 remaining teeth (10 opposing pairs)
Extent and distribution	Add to stage as descriptor	For each stage, describe extent as localized (<30% of teeth involved), generalized, or molar/incisor pattern			

### **1.2.5. Grado di parodontite**

Indipendentemente dallo stadio di parodontite alla diagnosi, la patologia può progredire con tassi diversi nei singoli individui, può rispondere in maniera meno predicibile al trattamento in alcuni pazienti, e può o meno influenzare la salute generale e un'eventuale malattia sistemica. Negli ultimi anni, strumenti validati di valutazione del rischio e la presenza di fattori di rischio validati individualmente sono stati associati alla perdita dei denti, indicando che è possibile stimare il rischio di progressione della parodontite e di perdita dei denti [Giannobile et al., 2013]. In passato, il grado di progressione della parodontite è stato incorporato nel sistema di classificazione definendo specifiche forme di parodontite con alti tassi di progressione o che presentano una distruzione più grave in un'epoca della vita relativamente precoce. Un limite importante nell'implementazione di questa conoscenza è stato l'assunto che tali forme di parodontite rappresentano entità diverse e quindi l'attenzione è stata posta sull'identificazione della forma piuttosto che sui fattori che contribuiscono alla progressione. Le revisioni commissionate per il workshop del 2017 hanno indicato che non vi sono prove che suggeriscano che tali forme di parodontite hanno una patofisiologia unica, piuttosto la complessa interazione dei fattori di rischio in un modello di malattia multifattoriale può spiegare i fenotipi della parodontite nei pazienti esposti [Tonetti et al., 2018]. In questo contesto, sembra utile fornire un quadro di riferimento per l'implementazione di un grado biologico (rischio o effettiva evidenza di progressione) della parodontite. Fattori di rischio riconosciuti, come il fumo di sigaretta o il controllo metabolico del diabete, influenzano il tasso di progressione della parodontite e, di conseguenza, possono accelerare la conversione da uno stadio a quello

successivo. Fattori di rischio emergenti come l'obesità, fattori genetici specifici, l'attività fisica o l'alimentazione potrebbero in futuro contribuire a tale valutazione, ed è necessario concepire un approccio flessibile per garantire che il sistema di definizione si adatterà alle prove emergenti [Lang et al., 2015].

La suddivisione in gradi della malattia parodontale permette quindi di considerare la velocità di progressione della malattia. La tabella 7 illustra la classificazione della parodontite in base a criteri primari rappresentati dalla disponibilità di prove dirette o indirette della progressione della parodontite. L'evidenza diretta si basa sull'osservazione longitudinale disponibile, ad esempio, sotto forma di precedenti radiografie di adeguata qualità diagnostica. L'evidenza indiretta si basa invece sulla valutazione della perdita ossea del dente più gravemente colpito in funzione dell'età (misurata come perdita ossea radiografica in percentuale della lunghezza della radice divisa per l'età del soggetto). Il grado di parodontite può inoltre essere modificato dalla presenza di fattori di rischio, in particolare fumo e diabete. L'obiettivo del grading è quello di utilizzare tutte le informazioni disponibili per determinare la probabilità che il caso progredisca ad un ritmo maggiore di quello tipico della maggior parte della popolazione o che risponda in modo meno prevedibile alla terapia standard [Tonetti et al., 2018].

I gradi di parodontite previsti dalla classificazione sono rappresentati dal grado A, B e C i quali rappresentano rispettivamente un grado di progressione di parodontite lenta, moderata e rapida. I clinici dovrebbero avvicinarsi alla classificazione assumendo un moderato tasso di progressione (grado B) e cercare misure dirette e indirette della progressione effettiva nel passato come mezzo per migliorare la definizione della prognosi per il singolo paziente. Se il paziente ha fattori di rischio che sono stati associati a una maggiore progressione della malattia o a una minore reattività alle terapie di



riduzione batterica, le informazioni sui fattori di rischio possono essere utilizzate per modificare la stima del futuro decorso della malattia del paziente. Un fattore di rischio, quindi, dovrebbe spostare il punteggio del grado di parodontite ad un valore più alto indipendentemente dal criterio primario rappresentato dal tasso di progressione.

**Tab. 7.** I tre gradi della malattia parodontale [Tonetti et al., 2018].

Periodontitis grade			Grade A: Slow rate of progression	Grade B: Moderate rate of progression	Grade C: Rapid rate of progression
Primary criteria	Direct evidence of progression	Longitudinal data (radiographic bone loss or CAL)	Evidence of no loss over 5 years	<2 mm over 5 years	≥2 mm over 5 years
	Indirect evidence of progression	% bone loss/age	<0.25	0.25 to 1.0	>1.0
		Case phenotype	Heavy biofilm deposits with low levels of destruction	Destruction commensurate with biofilm deposits	Destruction exceeds expectation given biofilm deposits; specific clinical patterns suggestive of periods of rapid progression and/or early onset disease (e.g., molar/incisor pattern; lack of expected response to standard bacterial control therapies)
Grade modifiers	Risk factors	Smoking	Non-smoker	Smoker <10 cigarettes/day	Smoker ≥10 cigarettes/day
		Diabetes	Normoglycemic/ no diagnosis of diabetes	HbA1c <7.0% in patients with diabetes	HbA1c ≥7.0% in patients with diabetes
Risk of systemic impact of periodontitis <sup>a</sup>	Inflammatory burden	High sensitivity CRP (hsCRP)	<1 mg/L	1 to 3 mg/L	>3 mg/L
Biomarkers	Indicators of CAL/bone loss	Saliva, gingival crevicular fluid, serum	?	?	?

In sintesi, una diagnosi di parodontite per un singolo paziente dovrebbe comprendere tre dimensioni:

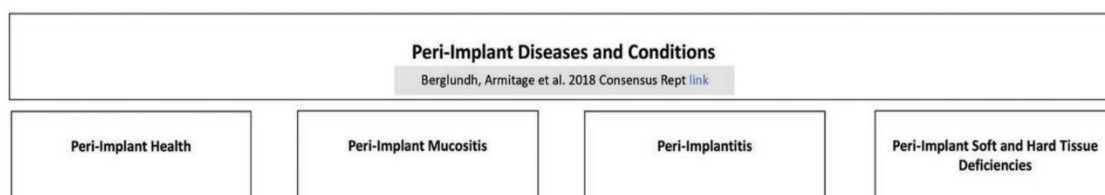
- 1) Definizione di un caso di parodontite basato sulla perdita di attacco clinico (CAL) rilevabile su due denti non adiacenti;
- 2) Identificazione della forma di parodontite: parodontite necrotizzante, parodontite come manifestazione di malattia sistemica o parodontite;
- 3) Descrizione della presentazione e dell'aggressività della malattia per stadio e grado.

### 1.3. LE PATOLOGIE PERIMPLANTARI

In aggiunta agli aspetti legati ai tessuti parodontali, la *Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions* del 2017 ha previsto la distinzione delle quattro seguenti malattie e condizioni che possono interessare i tessuti perimplantari (tabella 8) [Berglundh et al., 2018]:

1. Salute perimplantare;
2. Mucosite perimplantare;
3. Perimplantite;
4. Difetti dei tessuti perimplantari molli e duri.

**Tab. 8.** Malattie e condizioni perimplantari [Berglundh et al., 2018].



In particolare, la mucosite perimplantare è caratterizzata da sanguinamento al sondaggio e segni visivi di infiammazione. Mentre esiste una forte evidenza che la mucosite perimplantare è causata dalla placca, è presente un'evidenza molto scarsa per la mucosite perimplantare non indotta da placca [Sabancı et al., 2022]. La mucosite perimplantare può essere contrastata con misure atte ad eliminare il fattore eziologico rappresentato dalla placca.

La perimplantite viene definita come una condizione patologica associata a placca che

interessa i tessuti attorno agli impianti dentali con infiammazione della mucosa perimplantare e conseguente progressiva perdita di supporto osseo. In tal senso, si considera che la mucosite perimplantare preceda la perimplantite. Quest'ultima condizione è caratterizzata da uno scarso controllo della placca e con una storia di parodontite severa. La comparsa della perimplantite può verificarsi precocemente a seguito dell'inserimento degli impianti [Khammissa et al., 2012].

## 1.4. L'OZONOTERAPIA

### 1.4.1 Cenni storici

L'ozono è un composto naturale costituito da tre atomi di ossigeno; si trova in natura nella stratosfera, sotto forma di gas, in una concentrazione di 1-10 ppm [Bocci and Di Paolo, 2009]. La parola ozono deriva dalla parola greca "*ozein*" che significa odore, proprio a causa del caratteristico odore penetrante di questo composto. Si produce naturalmente dalla fotodissociazione dell'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) in atomi di ossigeno attivato che reagiscono con ulteriori molecole di ossigeno. Questo anione radicale transitorio viene rapidamente protonato, generando triossido di idrogeno ( $HO_3$ ) che, a sua volta, si decompone in un ossidante ancora più potente, il radicale ossidrile (OH) [Viebahn-Hänsler et al., 2012]. Entrambe queste reazioni chimiche sono catalizzate dalla luce ultravioletta ad altissima frequenza della luce solare; di conseguenza le radiazioni ultraviolette dannose che raggiungono l'atmosfera vengono assorbite dall'ozono che riveste pertanto un ruolo fondamentale sia nella regolazione termica della stratosfera che dell'ecosistema terrestre [Bocci, 2004]. La prima testimonianza della scoperta dell'ozono fu fatta dal fisico olandese Martin van Marum nel 1785 ma Christian Friedrich Schönbein, professore all'Università di Basilea, che dimostrò nel 1840 i cambiamenti delle proprietà dell'ossigeno con la formazione di quel particolare gas. Lo stesso ha anche rilevato per la prima volta la capacità dell'ozono di legarsi a substrati biologici nelle posizioni a doppio legame [Schwart and Sanchez, 2012].

La prima applicazione medica dell'ozono risale al 1870 quando il Dr. C. Lender purificò

del sangue in provette; il suo impiego si è poi diffuso in Europa e in America. A partire dal 1929 oltre 114 malattie sono state riconosciute sensibili al trattamento con ozono terapia. Il primo odontoiatra ad impiegare regolarmente acqua ionizzata nel proprio studio dentistico a Zurigo, in Svizzera, fu il Dr. E.A. Fisch (1899-1966) che pubblicò numerosi articoli sull'argomento [Stübinger et al., 2006]. Sulla scia degli studi di Fisch il chirurgo tedesco Erwin Payr (1871–1946) adoperò l'ozono in chirurgia e riferì i suoi risultati al 59° Congresso della German Surgical Society in Berlin nel 1935 [Bocci, 2005]. L'acqua ozonizzata veniva utilizzata per promuovere l'emostasi, migliorare l'apporto di ossigeno locale e inibire la proliferazione batterica [Celiberti et al., 2006]. Le proprietà microbiologiche e metaboliche dell'ozono lo rendono infatti un utile disinfettante con una ampia gamma di attività [Nagayoshi et al., 2004]. L'ozono, sia in fase gassosa che in fase acquosa, ha dimostrato di essere un potente e affidabile agente antimicrobico contro batteri, funghi, protozoi e virus [Holmes et al., 2003]; Il potenziale ossidante dell'ozono induce la distruzione delle pareti cellulari e delle membrane citoplasmatiche di batteri e funghi. Durante questo processo l'ozono attacca le glicoproteine, i glicolipidi e altri aminoacidi inibendo e bloccando il sistema di controllo enzimatico della cellula [Grootyeld et al., 2004]. Ciò si traduce in un aumento della permeabilità della membrana cellulare portando così a una cessazione funzionale immediata. Quindi le molecole di ozono possono facilmente entrare nella cellula e causare la morte del microrganismo [Bocci, 2004]. Inoltre, l'ozono può attaccare molte biomolecole come la cisteina, la metionina e i residui di istidina delle proteine [Schwart and Sanchez, 2012].

Durante la Prima guerra mondiale, il gas ozono veniva usato per curare la cancrena post- traumatica gassosa, ferite infette, ustioni da gas e fistole [Baysan, 2004]. Oggi la

terapia con ozono è una modalità di trattamento riconosciuta in 16 paesi [Elvis and Ekta, 2011]. Il suo utilizzo è stato sperimentato nel trattamento di problemi orali, oculari, infezioni batteriche acute e croniche, infezioni virali e fungine, malattie ischemiche, degenerazioni maculari legate all'età, malattie ortopediche, dermatologiche, polmonari, renali, ematologiche e neurodegenerative. Può inoltre reagire con la componente corpuscolare del sangue, favorire il metabolismo dell'ossigeno, l'immunomodulazione, il sistema di difesa antiossidante e la microcircolazione [Azarpazhooh and Limeback, 2008].

#### **1.4.2. Meccanismi di azione**

- **Inattivazione di microrganismi patogeni**

Secondo i dati di ricerca microbiologica, l'ozono è in grado di uccidere tutti i tipi noti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, tra cui *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, entrambi estremamente resistenti agli antibiotici [Ajamieh et al., 2005]. L'effetto antimicrobico dell'ozono è il risultato della sua azione dannosa nei confronti della membrana citoplasmatica delle cellule data dall'ozonolisi dei doppi legami e dalla modifica del contenuto intracellulare indotta dall'ozono a causa degli effetti ossidanti secondari. Quando i batteri sono esposti all'ozono *in vitro*, i fosfolipidi e le lipoproteine che fanno parte dell'involucro cellulare batterico vengono ossidati, in questo modo viene meno la stabilità della membrana cellulare batterica. L'ozono interagisce con le pareti cellulari fungine come con i batteri in quanto danneggia l'integrità della membrana citosolica e si infiltra nei microrganismi per ossidare glicoproteine, glicolipidi e bloccare la funzione enzimatica; la combinazione di queste

reazioni provoca l'inibizione della crescita e la mortalità di batteri e funghi [Bocci, 2008]. Inoltre, è stato dimostrato che l'ozono può interferire con il contatto virus-cellula nel caso di virus avvolti da lipidi, attraverso l'ossidazione di lipoproteine, proteine, e glicoproteine, interferendo così con i cicli riproduttivi virali [Mawsouf, 2012].

Shah et al. [Shah et al., 2019] ha dimostrato l'effetto del trattamento con ozono sulla crescita cellulare e sui cambiamenti strutturali in batteri come *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. L'ozono è molto efficace nei ceppi resistenti agli antibiotici, la sua attività antimicrobica aumenta nell'ambiente liquido, specialmente a pH acido. La sua azione è specifica e selettiva per le cellule microbiche; non danneggia infatti le cellule del corpo umano grazie alla capacità antiossidante delle cellule dei mammiferi [Dobkin et al., 2001]. È stato inoltre scoperto che l'ozono può essere generato in vivo nei neutrofili attivati [Galluccio, 2022]; questa scoperta ha un impatto notevole poiché dimostra che l'ozono ha un ruolo non solo come agente battericida, ma anche nei meccanismi fisiologici di amplificazione dell'infiammazione e dell'attivazione dei geni associati [Hidalgo-Tallon et al., 2013].

- **Attivazione del sistema immunitario**

L'ozono influenza il sistema immunitario cellulare e umorale favorendone la sua attivazione. Stimola infatti la proliferazione di cellule immunocompetenti e la sintesi di immunoglobuline, attiva la funzione dei macrofagi e aumenta la sensibilità dei microrganismi alla fagocitosi [Cespedes-Suarez et al., 2018]. È stato osservato l'aumento della produzione di interferone, del fattore di necrosi tumorale e di interleuchina-2; la produzione di quest'ultima dà il via a un'intera cascata di successive reazioni immunologiche [Takahashi et al., 2004]. Ciò significa che l'applicazione



dell'ozono medico è estremamente utile per l'attivazione immunitaria nei pazienti con uno stato immunitario basso e/o con deficit immunitario.

- **Azione analgesica e anti-infiammatoria**

Numerose ricerche scientifiche riconoscono che l'ozono ha un meccanismo a doppia azione: analgesico e antinfiammatorio. Questi effetti sembrano essere dovuti al suo modo di agire su diversi fronti: riduce la produzione dei mediatori dell'infiammazione, ossida e inattiva i mediatori metabolici del dolore, migliora la microcircolazione sanguigna locale con un conseguente miglioramento del rilascio di ossigeno ai tessuti [Bocci, 2011a]. L'ozono aiuta nella sintesi di sostanze biologicamente attive come interleuchine, leucotrieni e prostaglandine, utili nel ridurre infiammazione e dolore. I prodotti di infiammazione e infezione, in quanto sostanze acide, risultano carichi positivamente; essendo l'ozono caricato negativamente (basico), l'ozono viene attirato nei siti infiammatori/infettivi [Bocci, 2011b]. Uno studio condotto sugli effetti antinfiammatori dell'acqua ozonizzata in un modello sperimentale di topo ha suggerito che l'acqua ozonizzata ha proprietà antinfiammatorie ed è una potenziale opzione terapeutica per l'infiammazione acuta [Lipatov et al., 2002].

- **Azione anti-ipossica**

Gli effetti dell'ozono sul metabolismo dell'ossigeno possono essere spiegati grazie alla sua azione in grado di favorire i cambiamenti nelle proprietà reologiche del sangue e di aumentare la velocità della glicolisi dell'eritrocita [Rickard et al., 2004]. L'ozono provoca l'aumento di  $pO_2$  nei tessuti e migliora il trasporto di ossigeno nel sangue, con conseguente cambiamento dell'attivazione del metabolismo cellulare dei processi

aerobici (glicolisi, ciclo di Krebs, ossidazione B degli acidi grassi) e quindi l'utilizzo di risorse energetiche. L'ozono agisce come un superossidante, portando ossigeno ai tessuti e aiutando il corpo nel suo processo di guarigione naturale [Dukic et al., 2013].

### **1.4.3. Tossicità**

In caso di inalazione l'ozono risulta essere pericoloso per polmoni e altri organi interni. Le iniezioni endovenose di gas ozono sono state proibite dall'European Cooperation of Medical Ozone Societies a causa del rischio di embolia. L'ozonoterapia raramente provoca complicazioni (0,0007 per ogni applicazione); i possibili effetti collaterali noti sono [El Meligy et al., 2023]:

- epifora;
- irritazione delle vie respiratorie superiori;
- rinite;
- tosse;
- mal di testa;
- nausea e vomito;
- difficoltà di respirazione;
- vasculite;
- problemi di circolazione
- problemi cardiaci.

In caso si manifesti una reazione avversa all'ozono, il paziente deve essere posto in

posizione supina, inalare ossigeno umido e assumere n-acetilcisteina, acido ascorbico, e vitamina E [Nogales et al., 2008].

#### **1.4.4. Controindicazioni**

L'ozonoterapia è controindicata in caso di intossicazione da alcol, anemia, malattie autoimmuni, emorragia, ipertiroidismo, miastenia, infarto del miocardio, allergia all'ozono e gravidanza [Re et al., 2023].

#### **1.4.5. Modalità di somministrazione**

Esistono tre differenti forme di somministrazione dell'ozono [El Meligy et al., 2023]:

- Gas ozono: generato attraverso macchine con sistema di aspirazione aperto o chiuso. A causa degli effetti indesiderati che possono insorgere in caso di inalazione viene solitamente utilizzato il sistema di aspirazione chiuso;
- Acqua ozonizzata: utilizzata come collutorio per inibire batteri, virus e funghi o per la risoluzione di diversi problemi come alitosi e malattie parodontali. È un'alternativa più sicura rispetto all'ozono gassoso;
- Olio ozonizzato: vengono usati come base oli vegetali di diversa natura che subiscono un processo di ozonizzazione che consiste in una reazione chimica tra l'ozono e gli acidi grassi insaturi dell'olio. L'ozono in particolare ossida i doppi legami carbonio-carbonio mediante una reazione chiamata ozonolisi che porta

prima alla formazione di un composto instabile, il molozonuro, che si divide rapidamente in aldeide e ossido carbonilico. L'ossido carbonilico in ambiente anidro si combina con l'aldeide producendo un ozonuro secondario, sarà poi quest'ultimo a venire a contatto con i tessuti e quando ciò avviene l'ossido carbonilico reagisce con l'acqua producendo idrogeno perossido e una seconda molecola di aldeide [Baysan and Lynch, 2005]. Il meccanismo con il quale gli oli ozonizzati agiscono come antisettici è quindi l'ossidazione dei microrganismi attraverso un lento rilascio di perossidi. Rispetto alle altre formulazioni gli oli ozonizzati hanno il vantaggio di garantire una maggiore permeazione a contatto con la mucosa orale [Serafini et al., 2023].

#### **1.4.6. Applicazioni dell'ozonoterapia in odontoiatria**

L'ozonoterapia è stata impiegata in diversi campi dell'odontoiatria per diversi scopi. In particolare, le patologie e gli scopi per cui l'ozono potrebbe rappresentare un valido ausilio in ambito odontoiatrico sono i seguenti [Colombo et al., 2021]:

- Accelerazione della guarigione
- Gestione del dolore post-chirurgico
- Controllo della carie dentale
- Eliminazione della placca dentale
- Alitosi
- Ipersensibilità dentinale

- Lichen planus
- Gengivite e parodontite
- Terapia canalare endodontica
- Sbiancamento dentale
- Osteonecrosi dei mascellari
- Disordini temporomandibolari
- **Accelerazione della guarigione**

L'applicazione di acqua ionizzata su ulcerazioni della mucosa orale o ferite postchirurgiche ha mostrato un'accelerazione della velocità di guarigione delle stesse rispetto ai pazienti del gruppo di controllo che non hanno ricevuto il trattamento e hanno applicato acqua normale sulle ferite. Ciò può essere spiegato col fatto che il fattore di crescita trasformante beta viene prodotto in maggiore quantità in presenza di ozono [Isler et al., 2018].

- **Gestione del dolore post-chirurgico**

Il controllo del dolore è un aspetto importante della chirurgia orale, in quanto può influire negativamente sulla qualità di vita del paziente. L'ozonoterapia abbinata alla terapia laser si è dimostrata essere un ottimo mezzo di controllo del dolore, come è stato riscontrato da uno studio che ne ha sperimentato l'efficacia in seguito a un intervento di chirurgia orale, osservando una significativa diminuzione del dolore post-operatorio [Re et al., 2010].

- **Controllo della carie dentale**

La carie dentale, una delle malattie infettive più comuni nell'uomo, costituisce ancora un grave problema di salute pubblica in diversi paesi. Gli streptococchi mutans (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) sono i patogeni più comunemente isolati nella placca dentale umana, considerati i principali agenti eziologici della patologia cariosa. Secondo numerosi studi l'esposizione di questi batteri all'ozono provocherebbe una interruzione del processo di demineralizzazione della carie eliminando la necessità di rimozione della dentina infetta attraverso i metodi tradizionali; l'ozono può quindi essere di grande aiuto nella terapia preventiva. Un altro vantaggio è dato dal fatto che l'ozonoterapia viene accettata di buon grado anche da pazienti ansiosi e pediatrici il cui trattamento risulta spesso essere difficoltoso [Santos et al., 2020].

- **Eliminazione della placca dentale**

La placca dentale è un aggregato di microrganismi tenacemente adesi tra loro e alle superfici dentali, che promuove e sostiene le più comuni patologie orali quali carie e parodontopatie. I batteri che ne fanno parte crescono e si moltiplicano incorporati in una matrice polimerica. In uno studio condotto nel 2004, la placca dentale è stata esposta ad acqua ozonizzata; i risultati hanno mostrato una diminuzione del numero di *Streptococcus mutans*, e l'inibizione dell'accumulo di placca dentale. I risultati suggeriscono quindi che l'acqua ozonizzata potrebbe essere utile nella prevenzione delle infezioni causate dai microrganismi orali presenti nella placca dentale [Nicolini et al., 2021].

- **Alitosi**

L'alitosi è una condizione caratterizzata dall'emissione di odori sgradevoli attraverso l'atto respiratorio. Le cause sono numerose e vanno dalla banale ingestione di alimenti particolari alla manifestazione di problemi locali; denti cariati, parodontite, così come una cattiva igiene orale, sono spesso associati ad alitosi. Questo sintomo è causato dal ristagno interdentale di residui alimentari degradati dai batteri della placca; i responsabili sono principalmente i batteri che formano composti volatili a base di zolfo come l'idrogeno solforato e il metilmercaptano. Grazie alla sua azione battericida l'ozono può costituire uno strumento coadiuvante nel combattere l'alitosi [Froum et al., 2022].

- **Ipersensibilità dentinale**

L'ipersensibilità dentinale è una condizione caratterizzata da dolori brevi, acuti e intermittenti dovuti all'esposizione della dentina. Nei denti con dentina esposta si scoprono le aperture dei tubuli dentinali che contengono il fluido dentinale per cui stimoli esterni, termici, osmotici, chimici o meccanici, possono indurre rapidi movimenti del fluido, stimolando il nervo pulpare e le terminazioni nervose su cui sono presenti i meccanocettori, facendo in questo modo percepire dolore. Uno studio ha dimostrato che il trattamento con ozono favorisce una riduzione del dolore da ipersensibilità dentinale [Lena and Marianne, 2017].

- **Lichen planus**

Il lichen planus orale identifica una dermatosi infiammatoria cronica di derivazione

immunologica che coinvolge la mucosa orale. Si manifesta con macchie dal colore bianco o rossastro, ferite aperte (talvolta sanguinolente) e gonfiore tissutale. Nella maggior parte dei casi le lesioni del lichen planus orale provocano bruciore, dolore o, più raramente, prurito. È stato dimostrato che l'applicazione di ozono è efficace nell'aumentare la velocità di guarigione delle lesioni; i risultati hanno evidenziato un alleviamento dei sintomi alla fine del trattamento rendendolo così un buon sostituto alla terapia con farmaci steroidei [Serafini et al., 2023].

- **Gengivite e parodontite**

La gengivite è un processo infiammatorio che interessa le gengive. Si tratta di una condizione perfettamente reversibile, tuttavia se trascurata cronicizza evolvendosi in parodontite caratterizzata dalla distruzione dei tessuti che assicurano sostegno e stabilità ai denti. Sia la gengivite che la parodontite sono primariamente dovute alla placca dentale. Secondo i dati della letteratura, l'acqua ozonizzata (4 mg/ml) inibisce fortemente la formazione della placca dentale e riduce il numero di agenti patogeni nella tasca gengivale, sia Gram positivi che Gram negativi [Huth et al., 2011]. L'applicazione dell'ozono come irrigante in pazienti con parodontiti croniche ha mostrato un notevole miglioramento dell'infiammazione. Huth, et al. hanno confrontato l'efficacia dell'ozono rispetto alla clorexidina in pazienti parodontali non riscontrando significative differenze nel potere battericida [Yilmaz et al., 2013]. Dodwad et al. [Dodwad et al., 2011] hanno valutato l'effetto dell'irrigazione orale con acqua ozonizzata, clorexidina 0,2% e iodopovidone 10% in pazienti con parodontite cronica concludendo che l'applicazione locale di ozono può essere utile come potente agente



antimicrobico per il trattamento non chirurgico della malattia parodontale sia in studio che a casa. Costituisce inoltre un ottimo strumento durante la terapia parodontale di mantenimento. L'acqua ozonizzata può essere utilizzata anche come irrigante per gli strumenti a ultrasuoni e come risciacquo prima del trattamento di scaling e root planning. L'irrigazione della tasca parodontale con siringa durante il curettaggio non chirurgico riduce la carica batterica iniziale a livello locale [Colombo et al., 2021]; dopo il trattamento l'area può essere disinfettata tramite ozono gassoso che una volta insufflato penetra direttamente nei tessuti.

- **Terapia canalare endodontica**

Nel trattamento endodontico i classici prodotti chimici per l'irrigazione dei canali radicolari, quali l'ipoclorito di sodio (NaOCl), possono essere sostituiti dall'acqua ozonizzata. L'ozono è risultato efficace contro i microrganismi patogeni che risiedono nel canale radicolare come *E. faecalis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. È stato dimostrato che l'acqua ozonizzata irrigata con strumenti sonici aveva quasi la stessa attività antimicrobica dell'ipoclorito al 2,5%. Un vantaggio importante dell'ozono rispetto all'ipoclorito è rappresentato dalla sua assenza di tossicità per i tessuti [Huth et al., 2009]. Oli ozonizzati come olio di girasole, olio di oliva e olio di arachidi sono risultati efficaci nella sterilizzazione dei canali rispetto all'irrigazione convenzionale [Estrela et al., 2007]. L'ozono elimina anche l'odore caratteristico provocato da alcuni batteri anaerobi in denti con polpa infetta. Nagayoshi et al. hanno esaminato l'effetto dell'acqua ozonizzata contro le infezioni da *E. faecalis* e *S. mutans* trovando una significativa riduzione della vitalità di questi microrganismi [Nagayoshi et al., 2004]. L'ozono penetra anche attraverso il forame apicale ed entra nel tessuto osseo circostante

di supporto, promuovendo la guarigione e la rigenerazione dell'osso [Baysan et al., 2000].

- **Sbiancamento dentale**

Esistono varie tipologie di sbiancamento dentale sia professionale che domiciliare. Risulta tuttavia complicato il mascheramento di discromie gravi come quelle dovute all'assunzione di tetracicline durante il periodo di formazione dei denti, ovvero durante la seconda metà della gravidanza, il periodo neonatale e la prima infanzia [Sanchez et al., 2004]. Uno studio su modelli animali ha documentato la riduzione delle striature giallastre caratteristiche della discromia da tetraciclina attraverso l'impiego di ozono [Hammuda et al., 2013]. In un test condotto da Tessier et al., lo sbiancamento dentale con perossido di idrogeno al 38% in associazione a ozono ha prodotto denti più bianchi rispetto a quelli trattati solo col perossido di idrogeno [Tessier et al., 2010].

- **Osteonecrosi dei mascellari**

L'osteonecrosi è la morte del tessuto osseo, dovuta a un mancato o insufficiente afflusso di sangue, si manifesta in pazienti sottoposti alla terapia farmacologica a base di bifosfonati o denosumab, spontaneamente o dopo un trauma come un'estrazione dentale o una operazione di chirurgia orale [Petrucchi et al., 2007]. L'osteonecrosi provoca la comparsa di minuscole fratture a livello del tratto osseo interessato; nei casi più gravi, può determinare l'esposizione di osso alveolare e il suo collasso. La somministrazione di ozono si è dimostrata un efficace metodo per il trattamento dell'osteonecrosi post-operatoria, specialmente per i pazienti con lesioni di diametro superiore a 2,5 cm [Ripamonti et al., 2012].

#### **3.6.4. Disordini temporo-mandibolari**

I disordini temporo-mandibolari sono una serie di condizioni che determinano disfunzioni dell'articolazione dei mascellari o dolore ai mascellari e al volto. Il dolore è spesso all'interno o in prossimità dell'articolazione temporo-mandibolare ed esteso anche ai muscoli masticatori e ad altri muscoli del capo, alla loro fascia o a entrambe le strutture. I disturbi temporo-mandibolari sono tipicamente multifattoriali ma la maggior parte di essi sono legati a problemi relativi ai muscoli e ai legamenti delle articolazioni temporo-mandibolari oppure a lesioni interne nelle articolazioni stesse. I dati della letteratura sostengono la possibilità di trattare le patologie temporo-mandibolari attraverso l'iniezione di gas ozono intra-articolare, nella cavità articolare superiore [Daif, 2012]. L'ozonoterapia è risultata essere più efficace rispetto ad altri farmaci per il trattamento del dolore correlato a disordini temporo-mandibolari [Dolan et al., 2014].

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**

L'utilizzo dell'ozonoterapia si è ormai diffuso e consolidato in ogni branca dell'odontoiatria grazie ai numerosi vantaggi di questa sostanza quali la facilità di applicazione, l'assenza di citotossicità e la buona tolleranza da parte del paziente.

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'efficacia dell'applicazione sottogengivale di prodotti ozonizzati ad uso odontoiatrico (in forma di gel o oli ozonizzati) in aggiunta al trattamento convenzionale di SRP (scaling and root planing) nel trattamento della patologia parodontale e della mucosite perimplantare, confrontato con trattamenti di controllo. In aggiunta a ciò, si è voluto valutare l'efficacia di sostanze ozonizzate nel trattamento sbiancante di resine dentali composite di comune utilizzo in odontoiatria.

Nello specifico, la ricerca è stata condotta seguendo i seguenti filoni sperimentali:

- 1) Valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della malattia parodontale;
- 2) Valutazione dell'efficacia del gas ozonizzato rispetto alla fotobiomodulazione nel trattamento della malattia parodontale;
- 3) Valutazione dell'efficacia di un'acqua ozonizzata nel trattamento della mucosite perimplantare;
- 4) Valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nel trattamento della mucosite perimplantare;
- 5) Valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato come agente sbiancante di resine composite pigmentate con clorexidina;
- 6) Valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato come agente sbiancante di resine composite pigmentate con tè.

Le prime quattro tematiche sono state affrontate sperimentalmente attraverso la conduzione di trial clinici randomizzati controllati (RCT), rappresentando questi ultimi il disegno sperimentale più valido all'interno della piramide dell'evidenza per la valutazione dell'efficacia di trattamenti terapeutici. La descrizione dei materiali e metodi e dei risultati ottenuti da tali studi è basata sulle linee guida CONSORT per la relazione dei trial clinici randomizzati controllati.

Le ultime due linee sperimentali, relative all'efficacia sbiancante dell'ozono su resine dentali pigmentate, hanno previsto la conduzione di studi *in vitro*.

### **3. MATERIALI E METODI**

### 3.1. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della malattia parodontale

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia dell'applicazione subgingivale di un gel ozonizzato sperimentale in aggiunta al trattamento standard SRP (*scaling and root planing*) e di comparare tale protocollo rispetto all'utilizzo di gel alla clorexidina in aggiunta a SRP. L'ipotesi nulla dello studio corrisponde all'assenza di differenze significative intra- ed intergruppo tra i due differenti gel orali.

- *Materiali*

I prodotti utilizzati per la sperimentazione e le loro caratteristiche sono mostrate in tabella 9.

**Tab. 9.** Prodotti testati nello studio e relative composizioni [Colombo et al., 2021].

Product	Description	Ingredients	Manufacturer
GeliO <sub>3</sub>	Ozonized gel	Bio-ozonized olive oil (20 mEq O <sub>2</sub> /Kg), Hydrated Silica, Arnica	Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italy
Curasept Parodontal gel 1% Ads	Chlorhexidine gel	Sorbitol, Aqua, Hydrated Silica, Glycerin, Xylitol, PEG-40 Hydrogenated Castor Oil, Cocamidopropyl Betaine, Aroma, Cellulose Gum, Chlorhexidine, Digluconate, Ascorbic Acid, Sodium Metabisulfite, Sodium Saccharin, Sodium Methylparaben, Sodium Citrate, CI 42090	Curasept SPA, 21047 Saronno, Varese, Italy

- *Disegno dello studio*

Lo studio è stato disegnato come trial clinico randomizzato controllato con allocazione 1:1 ed è stato approvato da un comitato di revisione interna (numero di approvazione: 2020-0708). Lo studio è stato disegnato come studio *split-mouth* che prevede la suddivisione della bocca in quadranti.



- Partecipanti, criteri di eleggibilità, setting dello studio

Un consenso informato è stato fatto firmare ai pazienti prima di prendere parte allo studio. A partire da settembre 2020 fino a novembre 2020, dieci pazienti con malattia parodontale sono stati reclutati presso la Sezione di Odontoiatria del Dipartimento di Scienze Clinico, Chirurgiche e Pediatriche dell'Università di Pavia. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte presso la suddetta affiliata. Soggetti di entrambi i sessi, per poter essere reclutati nello studio, dovevano mostrare una parodontite di stadio III e grado B secondo la classificazione delle malattie parodontali del 2017.

I pazienti sono stati esclusi nel caso di: patologie sistemiche (es., diabete non controllato, anemia, malattie cardiovascolari, malattie infettive), patologie sistemiche legate alla parodontite, condizioni patologiche della mucosa orale, presenza di protesi fisse e apparecchiature ortodontiche, carie non trattate, utilizzo di tabacco, utilizzo di alcolici e/o fumo, trattamento con clorexidina nelle ultime sei settimane, utilizzo di farmaci sistemici (antibiotici, FANS, steroidi, inibitori del flusso salivare, anticoagulanti, immunostimolanti, immunosoppressori, antimicotici) e utilizzo contemporaneo di farmaci topici per il cavo orale. Infine, i pazienti sono stati esclusi nel caso di concomitante partecipazione ad altri trial clinici o in caso di mancanza di contatto telefonico.

- Trattamenti sperimentali e variabili rilevate

Durante la prima visita, i partecipanti sono stati sottoposti ad un'igiene orale professionale, inoltre informazioni sulle metodiche corrette di igiene orale sono state fornite nello stesso appuntamento. A distanza di due settimane i pazienti sono stati

sottoposti ad un'ulteriore visita ( $T_0$ ) in cui sono stati valutati i seguenti indici clinici: profondità di sondaggio della tasca (PPD) (distanza dal margine gengivale alla base della tasca), livello di attacco clinico (CAL) (differenza tra la posizione dei tessuti molli rispetto alla giunzione smalto-cemento), indice gengivale (GI, sec. Löe e Silness) (indice 1–3, proporzionale al grado di infiammazione gengivale), indice di placca (PI, sec. O'Leary) (percentuale di siti con placca) e sanguinamento al sondaggio (BoP, sec. Ainamo e Bay) (percentuale di siti che mostrano sanguinamento al sondaggio) [Colombo et al., 2021]. I primi due indici sono stati valutati rispettivamente su quattro siti per ciascun dente (mesiale, vestibolare, distale e linguale) mediante una sonda dentale (sonda UNC 15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), mentre i restanti tre indici sono stati misurati su sei siti (mesio-buccale, buccale, disto-buccale, mesio-linguale, linguale e disto-linguale). In questo stesso appuntamento i pazienti sono stati assegnati al rispettivo trattamento. Ogni quadrante della bocca dei partecipanti è stato assegnato in modo casuale ad un trattamento con SRP + gel di clorexidina (siti di controllo) e con SRP + gel di ozono (siti sperimentali), secondo il metodo di studio *split mouth*. Sono stati trattati solamente due o tutti e quattro i quadranti della bocca di ciascun paziente, a seconda del numero di siti con malattia parodontale. L'SRP è stato condotto utilizzando una curette piezoelettrica (Mini Piezon, EMS; Nyon, Svizzera) e una curette di Gracey (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), mentre il trattamento con i gel orali consisteva in un'applicazione sottogengivale e tramite siringa. Dopo 1 mese ( $T_1$ ) e 3 mesi ( $T_2$ ) dal basale ( $T_0$ ), i pazienti sono stati rivisitati e, qualora necessario, è stata effettuata un'ulteriore igiene orale professionale sopragengivale. Inoltre, gli indici clinici parodontali sono stati rivalutati come descritto in precedenza. Le istruzioni per una corretta igiene domiciliare sono state ripetute ai partecipanti ad ogni appuntamento.

- Calcolo della numerosità campionaria

È stato condotto un calcolo della dimensione del campione per due gruppi di studio indipendenti ed un outcome primario continuo, considerando alfa pari a 0.05 e la potenza dello studio al 90%. Per quanto riguarda la variabile “indice gengivale” è stata ipotizzata una media attesa di 1.80, con una deviazione standard di 0.60. Questa variabile è stata scelta come outcome primario, secondo gli studi considerati nella recente revisione sistematica con metanalisi di Akram et al. [Akram et al., 2020]. La differenza prevista tra le medie è stata supposta pari a 1.2, pertanto si sono resi necessari 10 pazienti da includere per gruppo.

- Randomizzazione, generazione della sequenza, occultamento dell’allocazione, implementazione

I partecipanti sono stati randomizzati al rispettivo gruppo di trattamento utilizzando una tabella dei numeri casuali. Sono stati considerati due blocchi permutati di cinque pazienti ciascuno. La sequenza di allocazione è stata nascosta attraverso l’utilizzo di buste opache, sigillate e numerate sequenzialmente, contenenti le carte di allocazione preparate prima dell’inizio dello studio.

La generazione della sequenza casuale di allocazione, l’arruolamento dei partecipanti e l’assegnazione agli interventi sono state realizzate da tre clinici differenti non ulteriormente coinvolti nello studio al fine di evitare un bias.

- Blinding

Le procedure professionali e la rilevazione degli outcome sono state rispettivamente

eseguite da due operatori. La cecità dell'operatore che ha somministrato il trattamento assegnato non è stato tecnicamente possibile ma quest'ultimo non è stato coinvolto in nessun'altra fase dello studio e non era in contatto con gli altri ricercatori. Al contrario, l'operatore che ha rilevato gli indici clinici e lo statistico sono risultati in cieco durante tutta la durata dello studio dal momento che nessuno di essi era a conoscenza del trattamento somministrato ad ogni partecipante. Ai pazienti è stato chiesto di non rivelare il trattamento assegnato all'operatore che ha condotto la raccolta dei dati clinici.

- Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il software R (versione 3.1.3., R Development Core 150 Team, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria). Per ogni variabile è stata calcolata la statistica descrittiva (media, deviazione standard, mediana, valore minimo e massimo). PPD e CAL sono stati misurati in millimetri, PI e BoP in percentuali e GI attraverso uno score da 0 a 3.

La normalità dei dati è stata calcolata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov e successivamente è stato condotto un test t di Student. La significatività statistica per tutti i test è stata posta considerando un *p-value* inferiore a 0.05.

### **3.2. Studio per la valutazione dell'efficacia del gas ozonizzato rispetto alla fotomodulazione nel trattamento della malattia parodontale**

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia dell'applicazione subgingivale di gas ozonizzato in aggiunta al trattamento standard SRP (*scaling and root planing*) e di comparare tale protocollo rispetto al trattamento con fotobiomodulazione in aggiunta a SRP. L'ipotesi nulla dello studio corrisponde all'assenza di differenze significative intra- ed intergruppo tra i due differenti trattamenti.

- *Disegno dello studio*

Lo studio è stato disegnato come trial clinico randomizzato controllato ed è stato approvato da un comitato di revisione interna (numero di approvazione: 2020-0610). Lo studio è stato disegnato come studio *split-mouth* che prevede la suddivisione della bocca in quadranti.

- Partecipanti, criteri di eleggibilità, setting dello studio

Un consenso informato è stato fatto firmare ai pazienti prima di prendere parte allo studio. I pazienti sono stati reclutati presso la Sezione di Odontoiatria del Dipartimento di Scienze Clinico, Chirurgiche e Pediatriche dell'Università di Pavia. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte presso la suddetta affiliata. Soggetti di entrambi i sessi, per poter essere reclutati nello studio, dovevano mostrare una parodontite di stadio III e grado B secondo la classificazione delle malattie parodontali del 2017.

I criteri di inclusione considerati sono stati i seguenti: età compresa tra 20 e 70 anni, presenza di parodontite in stadio II e III di grado A secondo la classificazione delle

malattie parodontali del 2017, assenza di pregressi interventi chirurgici negli ultimi dodici mesi.

I criteri di esclusione considerati sono stati, invece, la presenza di patologie sistemiche, la presenza di pacemaker cardiaco, lo stato di gravidanza o di allattamento, l'epilessia, le patologie neuro-psicologiche, l'abitudine al fumo, e l'assunzione di antibiotici o antinfiammatori.

- Trattamenti sperimentali e variabili rilevate

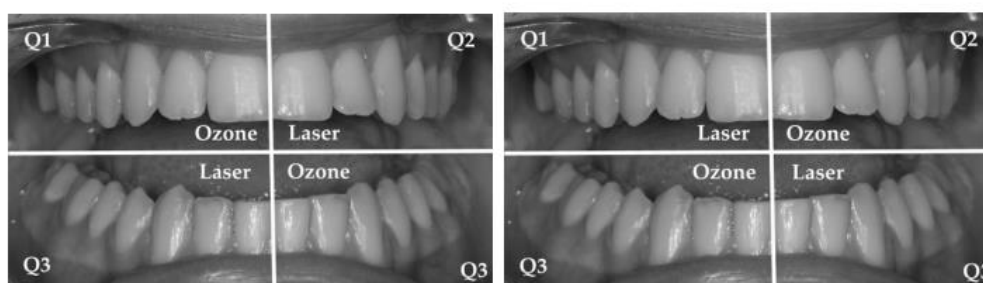
Durante la prima visita ( $T_0$ ), un operatore esperto ha raccolto, attraverso l'utilizzo di una sonda parodontale, i seguenti indici clinici misurati su sei siti per elemento: profondità di tasca (PPD) (distanza dal margine gengivale alla base della tasca), sanguinamento al sondaggio (BoP, sec. Ainamo e Bay) (percentuale di siti che mostrano sanguinamento al sondaggio), indice di sanguinamento (BS) e indice di placca (PI, sec. O'Leary) (percentuale di siti con placca) [Scribante et al., 2022]. A seguire, è stata condotta un'igiene sopra- e sottogengivale attraverso strumentazione piezoelettrica (Multipiezo, Mectron S.p.a., Carasco, Italia) e curette di Gracey (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), con successiva applicazione sopra- e sottogengivale di polvere di glicina (Mectron S.p.a., Carasco, Italia). In questa fase, i due siti patologici con i maggiori valori di PPD per ogni quadrante sono stati assegnati al trattamento. Secondo il modello di studio *split-mouth*: i pazienti sono stati assegnati in maniera randomizzata a due gruppi (figura 4):

- Gruppo A, a cui è stato somministrato gas ozonizzato (Ozone DTA generator, Sweden & Martina, Due Carrare, PD, Italia) ai denti appartenenti al primo e terzo quadrante mentre il secondo e quarto quadrante sono stati trattati con

fotobiomodulazione con laser a diodi AlGaInAs 980 nm (modello Giotto, Dental Medical Technologies, Lissone, MB, Italia) attraverso una fibra ottica di 200 nm;

- Gruppo B, a cui è stato somministrato gas ozonizzato (Ozone DTA generator, Sweden & Martina, Due Carrare, PD, Italia) ai denti appartenenti al secondo e quarto quadrante mentre il primo e terzo quadrante sono stati trattati con fotobiomodulazione con laser a diodi AlGaInAs 980 nm (modello Giotto, Dental Medical Technologies, Lissone, MB, Italia) attraverso una fibra ottica di 200 nm;

**Fig. 4.** Trattamenti somministrati ai pazienti del gruppo A (immagine a sinistra) e del gruppo B (immagine a destra) [Scribante et al., 2022].



L'ozono è stato somministrato inserendo una sonda di tipo 2 a potenza 6 all'interno delle tasche parodontale per una durata di circa 1 minuto per ogni centimetro quadrato. L'irraggiamento col laser è stato condotto utilizzando una fibra ottica di 200 nm, lunghezza d'onda di 980 nm, e potenza 1.5 W, con un'irradiazione pulsata di 1 minuto per sito; l'applicazione è stata condotta disponendo la punta della sonda perpendicolare al tessuto gengivale [Scribante et al., 2022]. La tabella 10 mostra i parametri dei

dispositivi utilizzati.

**Tab. 10.** Parametri di utilizzo dei dispositivi [Scribante et al., 2022].

Instrument	Manufacturer	Parameters
Ozone DTA generator	Sweden & Martina, Due Carrare, PD, Italy	Power: 6 Probe type: 3 Usage: 1 min/cm <sup>2</sup>
Giotto diode laser	Dental Medical Technologies, Lissone, MB, Italy	$\lambda = 980$ nm Frequency: 200 Hz Semiconductor: AlGaInAs Spot diameter of the optical fiber: 200 nm Power: 1.5 W Pulsation: ON 20 ms, OFF 30 ms Usage: 1 min per site Power density (irradiance): 100 mW/cm <sup>2</sup>

Dopo 1 mese (T<sub>1</sub>), 2 mesi (T<sub>2</sub>), 3 mesi (T<sub>3</sub>), 4 mesi (T<sub>4</sub>), 5 mesi (T<sub>5</sub>), e 6 mesi (T<sub>6</sub>) gli indici parodontali sono stati nuovamente rivalutati e un altro trattamento con ozono e fotobiomodulazione è stato condotto sugli stessi siti.

- Calcolo della numerosità campionaria

È stato condotto un calcolo della dimensione del campione per due gruppi di studio indipendenti ed un outcome primario continuo, considerando alfa pari a 0.05 e la potenza dello studio all'80%. Per quanto riguarda la variabile “profondità di sondaggio”, la differenza prevista tra le medie è stata supposta pari a 0.1305 [Yilmaz et al., 2013], pertanto si sono resi necessari 30 pazienti da includere per gruppo.

- Randomizzazione, generazione della sequenza, occultamento dell'allocazione, implementazione

I partecipanti sono stati randomizzati al rispettivo gruppo di trattamento utilizzando una



tabella dei numeri casuali. Sono stati considerati due blocchi permutati di trenta pazienti ciascuno. La sequenza di allocazione è stata nascosta attraverso l'utilizzo di buste opache, sigillate e numerate sequenzialmente, contenenti le carte di allocazione preparate prima dell'inizio dello studio.

La generazione della sequenza casuale di allocazione, l'arruolamento dei partecipanti e l'assegnazione agli interventi sono state realizzate da tre clinici differenti non ulteriormente coinvolti nello studio al fine di evitare un bias.

- Blinding

Le procedure professionali e la rilevazione degli outcome sono state rispettivamente eseguite da due operatori. La cecità dell'operatore che ha somministrato il trattamento assegnato non è stato tecnicamente possibile ma quest'ultimo non è stato coinvolto in nessun'altra fase dello studio e non era in contatto con gli altri ricercatori. Al contrario, l'operatore che ha rilevato gli indici clinici e lo statistico sono risultati in cieco durante tutta la durata dello studio dal momento che nessuno di essi era a conoscenza del trattamento somministrato ad ogni partecipante. Ai pazienti è stato chiesto di non rivelare il trattamento assegnato all'operatore che ha condotto la raccolta dei dati clinici.

- Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il software R (versione 3.1.3., R Development Core 150 Team, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria). Per ogni variabile è stata calcolata la statistica descrittiva (media, deviazione standard, mediana, valore minimo e massimo). PPD è stato misurato in millimetri, mentre PI e BoP

in percentuali.

La normalità dei dati è stata calcolata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov. Per la variabile PPD la statistica inferenziale per i confronti tra gruppi è stata realizzata attraverso il test ANOVA per misure ripetute e il test post hoc di Tukey. Per le variabili BOP e PI è stato utilizzato il test Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney. La significatività statistica per tutti i test è stata posta considerando un *p-value* inferiore a 0.05 per tutti i test statistici.

### **3.3. Studio per la valutazione dell'efficacia di acqua ozonizzata nel trattamento della mucosite perimplantare**

- *Materiali*

Lo spray d'acqua professionale Aquolab® (Aquolab s.r.l. EB2C S.r.l., Milano, Italia) è stato utilizzato per erogare acqua ozonizzata nelle tasche parodontali. Tale dispositivo è un irrigatore con una pompa magnetica che produce un rilascio continuo di acqua ozonizzata. La punta utilizzata aveva diametro di 0.8 mm ed è stata impostata la tensione massima (12 V). Sulla base delle indicazioni del produttore, è stato impostato il livello di acqua pari a 1 e il livello di ozono pari a 3. Il solo livello di acqua pari a 1 è stato utilizzato nel gruppo di controllo per erogare acqua pura.

- *Disegno dello studio*

Lo studio è stato disegnato come trial clinico randomizzato controllato con allocazione 1:1 ed è stato registrato sul portale Clinicaltrials.gov (numero di registrazione NCT: NCT04845087).

- *Partecipanti, criteri di eleggibilità, setting dello studio*

Un consenso informato è stato fatto firmare ai pazienti prima di prendere parte allo studio. Lo studio è stato condotto da aprile 2021 fino a luglio 2021 presso la Sezione di Odontoiatria del Dipartimento di Scienze Clinico, Chirurgiche e Pediatriche dell'Università di Pavia. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte presso la suddetta affiliata. Soggetti di entrambi i sessi, per poter essere reclutati nello studio, dovevano riportare i seguenti criteri di inclusione: età tra 18 e 70 anni, non fumatori,

assenza di malattie sistemiche, storia di parodontite (stadio II, grado B), utilizzo di spazzolino elettrico, presenza di una riabilitazione implantoprotesica con almeno due impianti, presenza di mucosite perimplantare in corrispondenza di almeno un impianto. La mucosite perimplantare viene definita, secondo la classificazione del 2017, in presenza di un indice BS superiore a zero [Berglundh et al., 2018]. Al contrario, i seguenti criteri sono stati considerati come criteri di esclusione: assenza di impianti dentali, presenza di malattie sistemiche, presenza di pacemaker cardiaco.

- Trattamenti sperimentali e variabili rilevate

Durante la prima visita (T<sub>0</sub>), un operatore esperto ha raccolto, attraverso l'utilizzo di una sonda parodontale, i seguenti indici clinici misurati su ogni sito perimplantare: profondità di tasca (PPD) (distanza dal margine gengivale alla base della tasca), sanguinamento al sondaggio (BoP, sec. Ainamo e Bay) (percentuale di siti che mostrano sanguinamento al sondaggio), indice di sanguinamento (BS) e indice di placca (PI, sec. O'Leary) (percentuale di siti con placca) [Butera et al., 2021]. A seguire, è stata condotta un'igiene sopra- e sottogengivale attraverso strumentazione piezoelettrica (Multipiezo, Mectron S.p.a., Carasco, Italia) e curette di Gracey (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), con successiva applicazione sopra- e sottogengivale di polvere di glicina (Mectron S.p.a., Carasco, Italia). I pazienti sono stati quindi assegnati in maniera randomizzata a due gruppi distinti sulla base del trattamento dei siti perimplantari:

- Gruppo 1 (gruppo sperimentale): somministrazione di acqua ozonizzata attraverso il dispositivo professionale Aquolab<sup>®</sup> per una durata di 60 secondi per sito con un'angolazione della punta di 45°;

- Gruppo 2 (gruppo di controllo): somministrazione di acqua pura attraverso il dispositivo professionale Aquolab® per una durata di 60 secondi per sito con un'angolazione della punta di 45°.

È stato raccomandato ai partecipanti di seguire le corrette norme di igiene orale domiciliare. È stato quindi condotto un follow up con un controllo a distanza di 1 mese (T<sub>1</sub>) e a 2 mesi (T<sub>2</sub>) dal primo appuntamento. Ad ogni controllo sono state ripetute le procedure di rilevazione degli indici clinici parodontali, la decontaminazione con polvere di glicina e l'erogazione di acqua ozonizzata o di acqua pura a seconda del trattamento iniziale assegnato.

- Calcolo della numerosità campionaria

È stato condotto un calcolo della dimensione del campione per due gruppi di studio indipendenti ed un outcome primario continuo, considerando alfa pari a 0.05 e la potenza dello studio al 95%. Per quanto riguarda la variabile “prodondità di sondaggio” è stata ipotizzata una media attesa di 4.6 mm, con una deviazione standard di 0.56 [Ji et al., 2014]. La differenza prevista tra le medie è stata supposta pari a 0.8, pertanto si sono resi necessari 13 pazienti da includere per ogni gruppo.

- Randomizzazione, generazione della sequenza, occultamento dell'allocazione, implementazione

I partecipanti sono stati randomizzati al rispettivo gruppo di trattamento utilizzando una tabella dei numeri casuali. Sono stati considerati due blocchi permutati di cinque pazienti ciascuno. La sequenza di allocazione è stata nascosta attraverso l'utilizzo di buste opache,

sigillate e numerate sequenzialmente, contenenti le carte di allocazione preparate prima dell'inizio dello studio.

- Blinding

Un primo operatore ha arruolato i pazienti e ha eseguito in cieco le procedure cliniche. Sulla base della sequenza di allocazione fornita, un altro operatore ha assegnato ogni partecipante al rispettivo gruppo di trattamento e ha impostato il dispositivo di erogazione di acqua ozonizzata/acqua pura. Un ulteriore operatore in cieco ha erogato il trattamento ai pazienti e ha misurato gli outcome. Né quest'ultimo operatore né i pazienti erano consapevoli del trattamento somministrato dal momento che non era presente alcuna differenza di sapore o colore tra i due trattamenti. Anche lo statistico è risultato in cieco.

- Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il software R (versione 3.1.3., R Development Core 150 Team, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria). Per ogni variabile è stata calcolata la statistica descrittiva (media, deviazione standard, mediana, valore minimo e massimo). PPD è stato misurato in millimetri, PI e BoP in percentuali e BS attraverso uno score da 0 a 3.

La normalità dei dati è stata calcolata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov. Per ogni variabile, i confronti inferenziali tra i gruppi sono stati condotti utilizzando il test ANOVA con il test post hoc di Tukey. La significatività statistica per tutti i test è stata posta considerando un *p-value* inferiore a 0.05.

### 3.4. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della mucosite perimplantare

- *Materiali*

I prodotti utilizzati per la sperimentazione e le loro caratteristiche sono mostrate in tabella 11.

**Tab. 11.** Prodotti testati nello studio e relative composizioni [Butera et al., 2023].

Gel	Manufacturer	Composition
Ozoral Gel and Ozoral Pro	Innovares Srl, Sant'Ilario d'Enza, RE, Italy	Aqua/water, ozonized sunflower seed oil/Helianthus annuus (sunflower) seed oil (product with ozone), aroma/flavor, glycerin, carbomer, polycarbophil, sodium hydroxide, sodium saccharin, illicium verum fruit/seed oil/illicium verum (anise) fruit/seed oil, glyceryl caprylate, tocopherol, ascorbyl palmitate, disodium EDTA, limonene, linalool.
Curasept Periodontal Gel (with 1% chlorhexidine)	Curasept S.p.A, Saronno, VA, Italy	Purified water, propylene glycol, hydroxy ethyl cellulose, PVP/VA copolymer, PEG-40 hydrogenated castor oil, chlorhexidine digluconate, sodium acetate, aroma, acetic acid, sodium metabisulfite, ascorbic acid.

- *Disegno dello studio*

Lo studio è stato disegnato come trial clinico randomizzato controllato con allocazione 1:1 ed è stato approvato da un comitato di revisione interna (numero di registrazione: 2022-0112) e registrato sul portale Clinicaltrials.gov (numero di registrazione NCT: NCT04845087).

- Partecipanti, criteri di eleggibilità, setting dello studio

Un consenso informato è stato fatto firmare ai pazienti prima di prendere parte allo studio. Lo studio è stato condotto da febbraio 2022 fino ad ottobre 2022 presso la Sezione di Odontoiatria del Dipartimento di Scienze Clinico, Chirurgiche e Pediatriche

dell'Università di Pavia. Tutte le procedure sperimentali sono state condotte presso la suddetta affiliata. Soggetti di entrambi i sessi, per poter essere reclutati nello studio, dovevano riportare i seguenti criteri di inclusione: età tra 18 e 70 anni; presenza di mucosite perimplantare secondo la classificazione del 2017 in corrispondenza di almeno due siti per quadrante con profondità di sondaggio superiore a 5 mm [Berglundh et al., 2018]; assenza di malattie sistemiche, metaboliche o autoimmuni; pazienti complianti.

Al contrario, i seguenti criteri sono stati considerati come criteri di esclusione: presenza di impianti con perimplantite diagnosticata con radiografie periapicali; presenza di parodontite; patologie neuropsichiatriche; uso di bifosfonati e di antibiotici negli ultimi dodici mesi; stato di gravidanza o di allattamento; ricorso a terapie antitumorali.

- Trattamenti sperimentali e variabili rilevate

Durante la prima visita ( $T_0$ ), un operatore esperto ha raccolto, attraverso l'utilizzo di una sonda parodontale, i seguenti indici clinici: profondità di tasca (PPD) (distanza dal margine gengivale alla base della tasca), indice di placca (PI, sec. O'Leary) (percentuale di siti con placca), indice di suppurazione (SI, presenza o assenza di suppurazione nel sito perimplantare), indice di sanguinamento (BS, presenza di sanguinamento al sondaggio su una scala da 0 a 3), stato della mucosa marginale (MMC, presenza di cambiamenti qualitativi della mucosa su una scala da 0 a 3) [Butera et al., 2023]. A seguire, è stata condotta un'igiene sopra- e sottogengivale attraverso strumentazione piezoelettrica (Multipiezo, Mectron S.p.a., Carasco, Italia), curette di Gracey (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), punte ultrasoniche in PEEK (IMplant Cleaning Set S, Mectron S.p.a., Carasco, Italia) e curette in titanio per i siti implantari (Implant Curette TIS2CN, Arnold Deppeler SA, Rolle, Svizzera), con successiva applicazione sopra- e sottogengivale di polvere di



glicina (Mectron S.p.a., Carasco, Italia).

Sulla base del disegno *split mouth*, i pazienti sono stati quindi assegnati in maniera randomizzata a due gruppi distinti sulla base del trattamento dei siti perimplantari:

- Gruppo 1: i siti affetti da mucosite perimplantare dei quadranti 1 e 3 sono stati trattati con applicazione di gel alla clorexidina (Curasept Gel Parodontale) mentre i quadranti 2 e 4 sono stati trattati a livello professionale con gel ozonizzato ad uso professionale (Ozoral Pro);
- Gruppo 2: i siti affetti da mucosite perimplantare dei quadranti 1 e 3 sono stati trattati a livello professionale con gel ozonizzato professionale (Ozoral Pro), mentre i quadranti 2 e 4 sono stati trattati con applicazione di gel alla clorexidina (Curasept Gel Parodontale).

A seguito dell'igiene professionale sopra- e sottogengivale, i suddetti trattamenti a base di gel sono stati applicati per almeno 2 minuti sui siti con mucosite perimplantare previo risciacquo degli stessi, asciugatura e isolamento con rullo di cotone.

I pazienti sono stati rivisitati a distanza di 1 mese (T<sub>1</sub>), 3 mesi (T<sub>2</sub>), e 6 mesi (T<sub>2</sub>) dal primo appuntamento. Ad ogni controllo sono state ripetute le procedure clinici precedentemente descritte, ad eccezione dell'igiene orale professionale che è stata ripetuta al termine dell'ultimo appuntamento.

Tra i vari appuntamenti, i pazienti sono stati invitati ad applicare a livello domiciliare una volta al giorno per 14 giorni il gel alla clorexidina e il gel ozonizzato (Ozoral Gel) negli stessi quadranti secondo lo schema seguito a livello professionale. Ai pazienti sono state fornite due differenti siringhe con ago di plastica smusso di diametro pari a 5-6 mm per

l'erogazione dei gel.

- Calcolo della numerosità campionaria

È stato condotto un calcolo della dimensione del campione per due gruppi di studio indipendenti ed un outcome primario continuo, considerando alfa pari a 0.05 e la potenza dello studio al 95%. Per quanto riguarda la variabile “prodondità di sondaggio” è stata ipotizzata una media attesa di 3.35 mm, con una deviazione standard di 1.10 [Isler et al., 2012]. La differenza prevista tra le medie è stata supposta pari a 0.59, pertanto, al fine della conduzione di uno studio *split mouth*, si sono resi necessari 90 siti di mucosite perimplantare per gruppo.

- Randomizzazione, generazione della sequenza, occultamento dell'allocazione, implementazione

I partecipanti sono stati randomizzati al rispettivo gruppo di trattamento utilizzando una tabella dei numeri casuali. È stato considerato un blocco permutato di 90 siti primplantari. Dopo l'assegnazione casuale ad un quadrante del trattamento sperimentale, il controlaterale è stato allocato al trattamento di controllo. La sequenza di allocazione è stata nascosta attraverso l'utilizzo di buste opache, sigillate e numerate sequenzialmente, contenenti le carte di allocazione preparate prima dell'inizio dello studio.

- Blinding

Un primo operatore ha condotto le procedure e la raccolta dei dati clinici dopo aver assegnato i quadranti dentali al rispettivo trattamento. I pazienti sono risultati in cieco per

l'assegnazione sia del trattamento professionale e domiciliare, sebbene i due differenti prodotti utilizzati per il trattamento domiciliare risultassero di colore e sapore differenti. Lo statistico è risultato in cieco durante l'intera durata dello studio.

- Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante il software R (versione 3.1.3., R Development Core 150 Team, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Austria). Per ogni variabile è stata calcolata la statistica descrittiva (media, deviazione standard, mediana, valore minimo e massimo). PPD è stato misurato in millimetri, PI e BoP in percentuali, SI attraverso uno score da 0 a 1, BS e MMC attraverso uno score da 0 a 3.

La normalità dei dati è stata calcolata attraverso il test di Kolmogorov-Smirnov. Sono stati poi condotti il test non parametrico di Friedman e, a seguire, il test di Kolmogorov-Smirnov. La significatività statistica per tutti i test è stata posta considerando un *p-value* inferiore a 0.05.

### **3.5. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nello sbiancamento di resine dentali composite pigmentate con clorexidina**

- *Disegno dello studio*

Lo studio è stato disegnato come studio pilota *in vitro*.

- Calcolo della numerosità campionaria

È stato condotto un calcolo della dimensione del campione per due gruppi di studio indipendenti ed un outcome primario continuo, considerando alfa pari a 0.05 e la potenza dello studio al 95%. Per quanto riguarda la variabile “delta E” è stata ipotizzata una media attesa di 1.28 mm, con una deviazione standard di 0.06 [Hafez et al., 2010]. La differenza prevista tra le medie è stata supposta pari a 0.14. Sulla base di tali calcoli è risultato necessario un numero di campioni pari a 5 per ogni gruppo per un totale di 40 campioni.

- Preparazione dei campioni

Lo studio è stato condotto da febbraio 2022 fino a maggio 2022 presso la Sezione di Odontoiatria del Dipartimento di Scienze Clinico, Chirurgiche e Pediatriche dell'Università di Pavia. 40 cilindri di composito di diametro pari a 6 mm e altezza pari a 2 mm sono stati realizzati tramite fotopolimerizzazione di una resina composita dentale di colore A3 (G-aenial, GC Italia, Vimodrone, Milano, Italia). I campioni sono stati preparati inserendo la resina non polimerizzata all'interno di stampi in acciaio inox, aventi diametro esterno di 8 mm, diametro interno di 6 mm e altezza di 4 mm, appoggiati su uno strato di carta opaca e scura con interposta una matrice in poliestere (Mylar strip, Henry Schein, Melville, NY, USA). Questa configurazione è stata scelta al fine di ottenere una superficie liscia al di sotto del composito e per evitare il riflesso di luce proveniente dal

fondo. Ogni stampo è stato riempito leggermente in eccesso e un'ulteriore matrice in poliestere è stata posta al di sopra al fine di evitare l'inibizione da parte dell'ossigeno nei confronti della polimerizzazione dello strato di resina più superficiale. Al fine di estrarre l'eccesso di composito e ottenere una superficie piatta, una piastra di vetro è stata pressata contro la matrice in poliestere e successivamente rimossa. A seguire, le resine sono state fotopolimerizzate attraverso lampada a LED (Celalux 2, Voco, Cuxhaven, Germania) mantenuta in carica prima di ogni utilizzo e la cui corretta irradianza è stata verificata attraverso un radiometro (SDS Kerr, Orange, California, USA). L'estremità della lampada è stata posizionata perpendicolarmente alla superficie della matrice, concentricamente agli stampi, prima di iniziare la polimerizzazione che ha interessato esclusivamente la superficie esterna. Il ciclo di polimerizzazione ha preso un'irradianza di  $1000 \text{ mW/cm}^2$  per 40 secondi.

Al fine di rifinire le superfici dei cilindri di composito a seguito della loro polimerizzazione, sono stati utilizzati dei dischi fini e superfini (Sof-Lex Pop On; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). Successivamente, i campioni sono stati misurati al fine di confermare le dimensioni iniziali; in caso di riduzione dell'altezza iniziale (2 mm), i campioni sono stati esclusi.

I campioni sono stati infine mantenuti per 48 ore in totale oscurità a  $37^\circ\text{C}$  e al 100% di umidità (soluzione fisiologica). Tale tempistica è stata presa in considerazione dal momento che la polimerizzazione del composito procede, a velocità ridotta, anche a seguito del momento dell'esposizione alla luce polimerizzante [Gallo et al., 2023].

- Procedura sperimentale

I 40 campioni sono stati divisi nei due gruppi seguenti:

- Gruppo A: 20 campioni sono stati sottoposti ad un trattamento di pigmentazione consistente in dieci applicazioni di dieci minuti ciascuno di un gel di clorexidina all'1% (Corsodyl, GSK, Brentford, UK);
- Gruppo B: 20 campioni sono stati conservati per ulteriori 24 ore in soluzione fisiologica.

I campioni dei rispettivi gruppi sono stati ulteriormente suddivisi in quattro sottogruppi di cinque campioni ciascuno i quali sono stati sottoposti a differenti trattamenti secondo il seguente protocollo:

- Gruppo A1 e B1: due applicazioni di 60 minuti ciascuna di gel ozonizzato (Gelio3, Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italia) a base di olio di oliva ozonizzato (20 mEq O<sub>2</sub>/kg), silice idratata e arnica;
- Gruppo A2 e B2: due applicazioni di 60 minuti ciascuna di gel ozonizzato (Gelio3, Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italia) a base di olio di oliva ozonizzato (20 mEq O<sub>2</sub>/kg);
- Gruppo A3 e B3: due applicazioni di 60 minuti ciascuna di gel ozonizzato (Gelio3, Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italia) a base di olio di oliva ozonizzato (20 mEq O<sub>2</sub>/kg) e sostanza rigenerante (mirra);
- Gruppo A4 e B4 (gruppi di controllo): conservazione in soluzione fisiologica.

Al termine della procedura i campioni sono stati risciacquati con soluzione fisiologica, delicatamente asciugati con siringa aria-acqua e conservati in acqua distillata a 37 °C.

- Analisi colorimetrica

I campioni sono stati analizzati in tre momenti differenti: dopo 24 ore di conservazione

in soluzione fisiologica (prima delle procedure sperimentali) ( $T_0$ ), dopo la suddivisione in gruppo A e B (corrispondente alla pigmentazione per i campioni del gruppo A e alla conservazione in soluzione fisiologica per i campioni del gruppo B) ( $T_1$ ), e dopo la suddivisione nei sottogruppi 1-4 (corrispondenti all'applicazione dei prodotti ozonizzati versus controllo) ( $T_2$ ).

L'analisi colorimetrica è stata realizzata attraverso il metodo CIELAB. Questo sistema è legato alla percezione umana del colore in tutte e tre le dimensioni o direzioni dello spazio colore. La formula utilizzata è la seguente:

$$DE^*_{ab} = [(DL^*)^2 + (Da^*)^2 + (Db^*)^2]^{1/2}$$

$E^*$  rappresenta la variazione di colore,  $L^*$  la luminosità (proporzionale al valore di Munsell),  $a^*$  e  $b^*$  sono le coordinate di cromaticità. Lo spazio  $L^*a^*b^*$  consiste nella coordinata di luminosità  $L^*$ , nella coordinata  $a^*$  che indica dove cade il colore tra lungo l'asse rosso/viola – verde/blu, e nella coordinata  $b^*$  che indica dove cade il colore lungo l'asse blu/viola-giallo [Gomez-Polo et al., 2016].

L'analisi colorimetrica è stata condotta utilizzando uno spettrofotometro ad uso odontoiatrico (Vita Easyshade<sup>®</sup> V, Vita Zahnfabrik, Germania) che ha fornito digitalmente i parametri sopramenzionati. Al fine di standardizzare l'analisi dei parametri e di ridurre l'influenza della luce esterna, la punta dello spettrofotometro è stata posta a contatto con i campioni con un angolo di incidenza di 90° (perpendicolarmente). L'esperimento è stato condotto in una stanza ombreggiata senza diretta esposizione a luce ambientale o artificiale.

- Analisi statistica

Per ogni variabile, è stata calcolata la statistica descrittiva (media, mediana, valore massimo e minimo). Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato condotto per valutare la normalità dei dati. Il test di Friedman e il test di Dunn sono stati successivamente applicati per calcolare la statistica inferenziale, considerando un p value pari a 0.05. Le analisi statistiche sono state condotte tramite il software R (Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).



### **3.6. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nello sbiancamento di resine dentali composite pigmentate con tè**

- *Disegno dello studio*

Lo studio è stato disegnato come studio *in vitro*.

- Calcolo della numerosità campionaria

È stato condotto un calcolo della dimensione del campione per due gruppi di studio indipendenti ed un outcome primario continuo, considerando alfa pari a 0.05 e la potenza dello studio al 95%. Per quanto riguarda la variabile “delta E” è stata ipotizzata una media attesa di 1.28 mm, con una deviazione standard di 0.06 [Hafez et al., 2010]. La differenza prevista tra le medie è stata supposta pari a 0.14. Sulla base di tali calcoli è risultato necessario un numero di campioni pari a 5 per ogni gruppo per un totale di 40 campioni.

- Preparazione dei campioni

Lo studio è stato condotto da febbraio 2022 fino a maggio 2022 presso la Sezione di Odontoiatria del Dipartimento di Scienze Clinico, Chirurgiche e Pediatriche dell'Università di Pavia. 40 cilindri di composito di diametro pari a 6 mm e altezza pari a 2 mm sono stati realizzati tramite fotopolimerizzazione di una resina composita dentale di colore A3 (G-aenial, GC Italia, Vimodrone, Milano, Italia). I campioni sono stati preparati inserendo la resina non polimerizzata all'interno di stampi in acciaio inox, aventi diametro esterno di 8 mm, diametro interno di 6 mm e altezza di 4 mm, appoggiati su uno strato di carta opaca e scura con interposta una matrice in poliestere (Mylar strip, Henry Schein, Melville, NY, USA). Questa configurazione è stata scelta al fine di ottenere una superficie liscia al di sotto del composito e per evitare il riflesso di luce proveniente dal

fondo. Ogni stampo è stato riempito leggermente in eccesso e un'ulteriore matrice in poliestere è stata posta al di sopra al fine di evitare l'inibizione da parte dell'ossigeno nei confronti della polimerizzazione dello strato di resina più superficiale. Al fine di estrarre l'eccesso di composito e ottenere una superficie piatta, una piastra di vetro è stata pressata contro la matrice in poliestere e successivamente rimossa. A seguire, le resine sono state fotopolimerizzate attraverso lampada a LED (Celalux 2, Voco, Cuxhaven, Germania) mantenuta in carica prima di ogni utilizzo e la cui corretta irradianza è stata verificata attraverso un radiometro (SDS Kerr, Orange, California, USA). L'estremità della lampada è stata posizionata perpendicolarmente alla superficie della matrice, concentricamente agli stampi, prima di iniziare la polimerizzazione che ha interessato esclusivamente la superficie esterna. Il ciclo di polimerizzazione ha preso un'irradianza di  $1000 \text{ mW/cm}^2$  per 40 secondi.

Al fine di rifinire le superfici dei cilindri di composito a seguito della loro polimerizzazione, sono stati utilizzati dei dischi fini e superfini (Sof-Lex Pop On; 3M ESPE, St. Paul, MN, USA). Successivamente, i campioni sono stati misurati al fine di confermare le dimensioni iniziali; in caso di riduzione dell'altezza iniziale (2 mm), i campioni sono stati esclusi.

I campioni sono stati infine mantenuti per 48 ore in totale oscurità a  $37^\circ\text{C}$  e al 100% di umidità (soluzione fisiologica). Tale tempistica è stata presa in considerazione dal momento che la polimerizzazione del composito procede, a velocità ridotta, anche a seguito del momento dell'esposizione alla luce polimerizzante [Gallo et al., 2023].

- Procedura sperimentale

I 40 campioni sono stati divisi nei due gruppi seguenti:

- Gruppo A: 20 campioni sono stati sottoposti ad un trattamento di pigmentazione consistente in dieci applicazioni di dieci minuti ciascuno di una soluzione di tè a 37 °C (Lipton, Glasgow, Scozia);
- Gruppo B: 20 campioni sono stati conservati per ulteriori 24 ore in soluzione fisiologica.

I campioni dei rispettivi gruppi sono stati ulteriormente suddivisi in quattro sottogruppi di cinque campioni ciascuno i quali sono stati sottoposti a differenti trattamenti secondo il seguente protocollo:

- Gruppo A1 e B1: due applicazioni di 60 minuti ciascuna di gel ozonizzato (Gelio3, Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italia) a base di olio di oliva ozonizzato (20 mEq O<sub>2</sub>/kg), silice idratata e arnica;
- Gruppo A2 e B2: due applicazioni di 60 minuti ciascuna di gel ozonizzato (Gelio3, Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italia) a base di olio di oliva ozonizzato (20 mEq O<sub>2</sub>/kg);
- Gruppo A3 e B3: due applicazioni di 60 minuti ciascuna di gel ozonizzato (Gelio3, Bioemmei Srl, 36100 Vicenza, Italia) a base di olio di oliva ozonizzato (20 mEq O<sub>2</sub>/kg) e sostanza rigenerante (mirra);
- Gruppo A4 e B4 (gruppi di controllo): conservazione in soluzione fisiologica.

Al termine della procedura i campioni sono stati risciacquati con soluzione fisiologica, delicatamente asciugati con siringa aria-acqua e conservati in acqua distillata a 37 °C.

- Analisi colorimetrica

I campioni sono stati analizzati in tre momenti differenti: dopo 24 ore di conservazione

in soluzione fisiologica (prima delle procedure sperimentali) ( $T_0$ ), dopo la suddivisione in gruppo A e B (corrispondente alla pigmentazione per i campioni del gruppo A e alla conservazione in soluzione fisiologica per i campioni del gruppo B) ( $T_1$ ), e dopo la suddivisione nei sottogruppi 1-4 (corrispondenti all'applicazione dei prodotti ozonizzati versus controllo) ( $T_2$ ).

L'analisi colorimetrica è stata realizzata attraverso il metodo CIELAB. Questo sistema è legato alla percezione umana del colore in tutte e tre le dimensioni o direzioni dello spazio colore. La formula utilizzata è la seguente:

$$DE^*_{ab} = [(DL^*)^2 + (Da^*)^2 + (Db^*)^2]^{1/2}$$

$E^*$  rappresenta la variazione di colore,  $L^*$  la luminosità (proporzionale al valore di Munsell),  $a^*$  e  $b^*$  sono le coordinate di cromaticità. Lo spazio  $L^*a^*b^*$  consiste nella coordinata di luminosità  $L^*$ , nella coordinata  $a^*$  che indica dove cade il colore tra lungo l'asse rosso/viola – verde/blu, e nella coordinata  $b^*$  che indica dove cade il colore lungo l'asse blu/viola-giallo [Gomez-Polo et al., 2016].

L'outcome analizzato in questo studio, a differenza del precedente studio pilota, è rappresentato dal valore delta E ( $\Delta E$ ) che rappresenta la variazione cromatica. Tale parametro è stato scelto come unico parametro in quanto riassuntivo degli altri indici precedentemente elencati. Il  $\Delta E$  si misura su una scala che va da 0 a 100, dove con 0 si indica la minor differenza di colore possibile e con 100 si indica la distorsione completa dei colori. In particolare, gli intervalli di percezione standard dei colori sono i seguenti [Gomez-Polo et al., 2016]:

- $\Delta E \leq 1,0$ : Variazione di colore non percepibile dall'occhio umano;
- $\Delta E = 1-2$ : Variazione di colore percepibile attraverso un'osservazione meticolosa ed a distanza ravvicinata
- $\Delta E = 2-10$ : Variazione di colore percepibile ad occhio nudo
- $\Delta E = 11-49$ : I colori sono molto più simili che completamente opposti
- $\Delta E = 100$ : I colori sono esattamente opposti

L'analisi colorimetrica è stata condotta utilizzando uno spettrofotometro ad uso odontoiatrico (Vita Easyshade<sup>®</sup> V, Vita Zahnfabrik, Germania) che ha fornito digitalmente i parametri sopramenzionati. Al fine di standardizzare l'analisi dei parametri e di ridurre l'influenza della luce esterna, la punta dello spettrofotometro è stata posta a contatto con i campioni con un angolo di incidenza di 90° (perpendicolarmente). L'esperimento è stato condotto in una stanza ombreggiata senza diretta esposizione a luce ambientale o artificiale.

- Analisi statistica

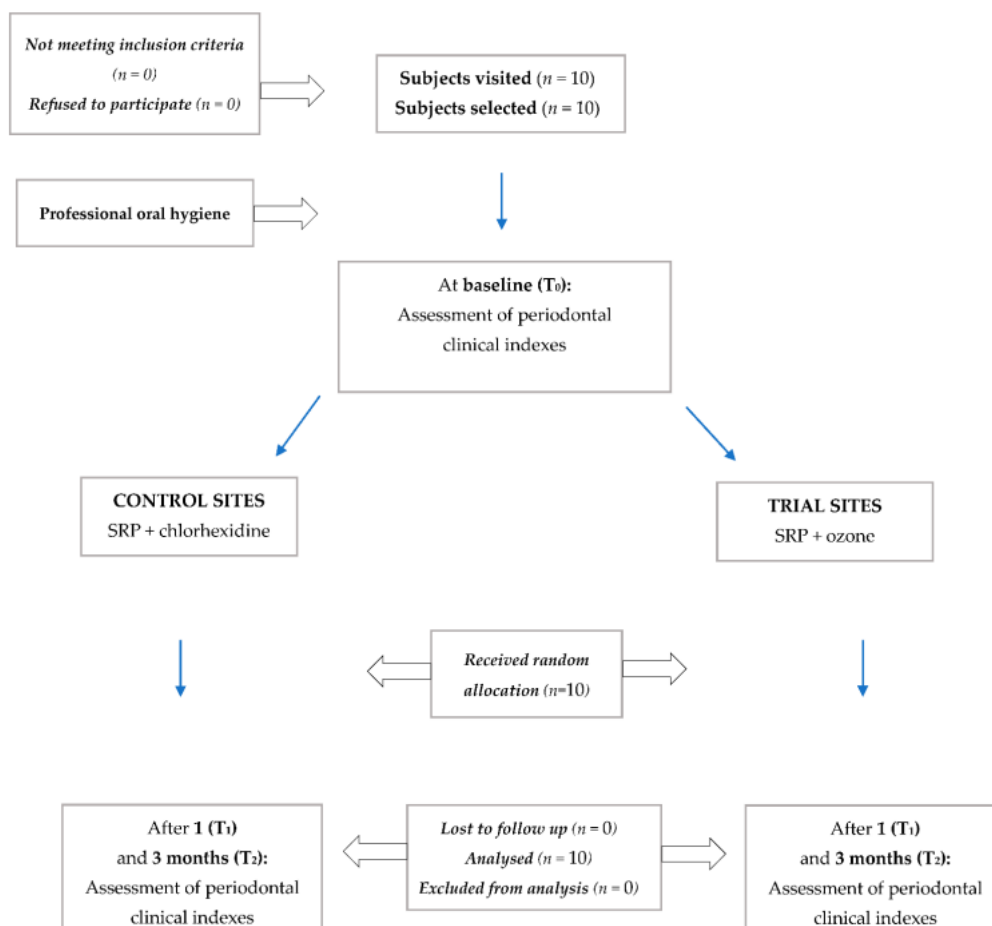
Per ogni variabile, è stata calcolata la statistica descrittiva (media, mediana, valore massimo e minimo). Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato condotto per valutare la normalità dei dati. Il test di Friedman e il test di Dunn sono stati successivamente applicati per calcolare la statistica inferenziale, considerando un p value pari a 0.05. Le analisi statistiche sono state condotte tramite il software R (Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## **4. RISULTATI**

#### 4.1. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto ad un gel di clorexidina nel trattamento della malattia parodontale

- Flusso dei partecipanti

La flow chart CONSORT dello studio è mostrata in figura 5. I quadranti della bocca dei 10 pazienti (4 maschi e 6 femmine, età media 50 anni) sono stati randomizzati con un rapporto 1:1. Nessun paziente si è rifiutato di partecipare allo studio, pertanto sono stati tutti assegnati al rispettivo trattamento. Non si è verificata nessuna uscita di pazienti dallo studio durante la sperimentazione o esclusione dalle analisi statistiche.



**Fig. 5.** Flow-chart CONSORT dello studio [Colombo et al., 2021].

- Reclutamento

I partecipanti sono stati reclutati da settembre 2020 fino a novembre 2020. Sulla base di un follow up a tre mesi, lo studio è terminato a febbraio 2021. Il trial clinico non è terminato né è stato interrotto in anticipo.

- Dati basali

I partecipanti dello studio sono stati 4 uomini e 6 donne, con un'età media di 50 anni. Le caratteristiche cliniche basali dei pazienti sono riportate in tabella 12, distinguendo i siti sperimentali e di controllo.

**Tab. 12.** Caratteristiche cliniche basali dei pazienti [Colombo et al., 2021].

Clinical Indexes	Control Sites (Mean $\pm$ SD)	Trial Sites (Mean $\pm$ SD)
PPD (mm)	5.94 $\pm$ 0.89	6.21 $\pm$ 0.92
CAL (mm)	6.13 $\pm$ 0.81	6.00 $\pm$ 0.83
GI (0-3)	1.67 $\pm$ 0.39	1.67 $\pm$ 0.56
PI (%)	0.86 $\pm$ 0.16	0.85 $\pm$ 0.18
BOP (%)	Cs: 0.33 $\pm$ 0.13	0.43 $\pm$ 0.27

SD: standard deviation.

- Numeri analizzati

Tutti i pazienti sono stati inclusi nelle analisi statistiche.

- Risultati

Le statistiche descrittive degli indici clinici rilevati sono mostrate in tabella 13.



**Tab. 13.** Statistica descrittiva degli indici clinici rilevati [Colombo et al., 2021].

Clinical Index	Treatment	Time	Mean	SD	Min	Median	Max	Intragroup Differences *	Intergroup Differences *
PPD (mm)	SRP + Ozone	T <sub>0</sub>	6.21	0.92	5.25	6.27	8.40	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	T <sub>0</sub> -T <sub>0</sub> $p > 0.05$ T <sub>1</sub> -T <sub>1</sub> $p > 0.05$ T <sub>2</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$
		T <sub>1</sub>	4.66	0.74	3.83	4.48	5.50	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	4.20	0.48	3.50	4.15	5.20	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$	
	SRP + Chlorhexidine	T <sub>0</sub>	5.94	0.89	5.00	5.89	7.50	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>1</sub>	4.42	0.76	3.37	4.35	5.78	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	3.95	0.52	3.25	3.90	4.95	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$	
CAL (mm)	SRP + Ozone	T <sub>0</sub>	6.00	0.83	5.10	5.89	7.50	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	T <sub>0</sub> -T <sub>0</sub> $p > 0.05$ T <sub>1</sub> -T <sub>1</sub> $p > 0.05$ T <sub>2</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$
		T <sub>1</sub>	4.42	0.76	3.37	4.35	5.78	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	4.32	0.47	3.45	4.32	4.94	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$	
	SRP + Chlorhexidine	T <sub>0</sub>	6.13	0.81	5.25	6.06	8.00	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>1</sub>	4.85	0.90	3.83	4.54	6.50	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	3.99	0.56	3.15	4.05	4.91	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
GI (1-3)	SRP + Ozone	T <sub>0</sub>	1.67	0.56	0.80	1.54	2.56	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	T <sub>0</sub> -T <sub>0</sub> $p > 0.05$ T <sub>1</sub> -T <sub>1</sub> $p > 0.05$ T <sub>2</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$
		T <sub>1</sub>	1.01	0.38	0.50	0.95	1.60	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	0.91	0.35	0.37	0.93	1.45	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$	
	SRP + Chlorhexidine	T <sub>0</sub>	1.67	0.39	0.87	1.80	2.14	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>1</sub>	1.06	0.38	0.45	1.15	1.50	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	0.71	0.36	0.05	0.75	1.30	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
PI (%)	SRP + Ozone	T <sub>0</sub>	85	18	55	90	100	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	T <sub>0</sub> -T <sub>0</sub> $p > 0.05$ T <sub>1</sub> -T <sub>1</sub> $p > 0.05$ T <sub>2</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$
		T <sub>1</sub>	54	9	40	50	70	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	39	7	27	40	50	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
	SRP + Chlorhexidine	T <sub>0</sub>	86	16	60	90	100	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>1</sub>	52	7	40	50	65	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	36	8	25	34	50	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
BOP (%)	SRP + Ozone	T <sub>0</sub>	43	27	7	40	87	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	T <sub>0</sub> -T <sub>0</sub> $p > 0.05$ T <sub>1</sub> -T <sub>1</sub> $p > 0.05$ T <sub>2</sub> -T <sub>2</sub> $p > 0.05$
		T <sub>1</sub>	15	6	5	17	24	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	9	4	2	9	15	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
	SRP + Chlorhexidine	T <sub>0</sub>	33	13	18	31	50	T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>1</sub>	11	7	2	10	24	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	
		T <sub>2</sub>	9	6	2	7	17	T <sub>1</sub> -T <sub>2</sub> $p < 0.05$	

\* Significant differences for  $p < 0.05$ . SD: standard deviation.

*Profondità di sondaggio (PPD)*: differenze intragruppo significative sono state rilevate tra ogni tempo di valutazione per i siti trattati con SRP + ozono e per i siti trattati con SRP + clorexidina ( $p < 0.05$ ). Nessuna differenza intergruppo è stata rilevata tra i siti ( $p > 0.05$ ) (tabella 13). In particolare, la tabella 14 mostra i dati relativi alla riduzione dei valori di PPD da T<sub>0</sub> a T<sub>2</sub> sia nei siti trial che nei siti controllo.

**Tab. 14.** Riduzione dell'indice PPD nei siti trial e controllo dall'inizio al termine dello studio [Colombo et al., 2021].

PPD (mm)	T <sub>0</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>0</sub> -T <sub>2</sub>	SD
SRP + Ozone	6.21	4.20	2.01	1.42
SRP + Chlorhexidine	5.94	3.95	1.99	1.41

SD: standard deviation.

*Perdita di attacco clinico (CAL)*: differenze intragruppo significative sono state rilevate tra ogni tempo di valutazione per i siti trattati con SRP + clorexidina ( $p<0.05$ ), mentre per l'ozono è stato rilevato un miglioramento significativo a T<sub>1</sub> ma non a T<sub>2</sub>; una differenza intergruppo significativa è stata rilevata tra i siti al T<sub>2</sub> ( $p<0.05$ ) (tabella 13).

*Indice gengivale (GI)*: differenze significative intragruppo sono state rilevate tra ogni tempo di valutazione sia per i siti trattati con SRP + ozono (tranne nel confronto T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub>) sia per i siti trattati con SRP + clorexidina ( $p<0.05$ ); una differenza intergruppo significativa è stata rilevata tra i siti a T<sub>2</sub> ( $p<0.05$ ) (tabella 13).

*Indice di placca (PI)*: differenze intragruppo significative sono state rilevate tra ogni tempo di valutazione per i siti trattati con SRP + ozono e per i siti trattati con SRP + clorexidina ( $p<0.05$ ). Nessuna differenza intergruppo è stata rilevata tra i siti ( $p>0.05$ ) (tabella 13).

*Sanguinamento al sondaggio (BoP)*: differenze intragruppo significative sono state rilevate tra ogni tempo di valutazione per i siti trattati con SRP + ozono e per i siti trattati con SRP + clorexidina ( $p<0.05$ ). Nessuna differenza intergruppo è stata rilevata tra i siti ( $p>0.05$ ) (tabella 13).

- Analisi ancillari

Nessuna ulteriore analisi è stata condotta rispetto a quelle inizialmente previste.

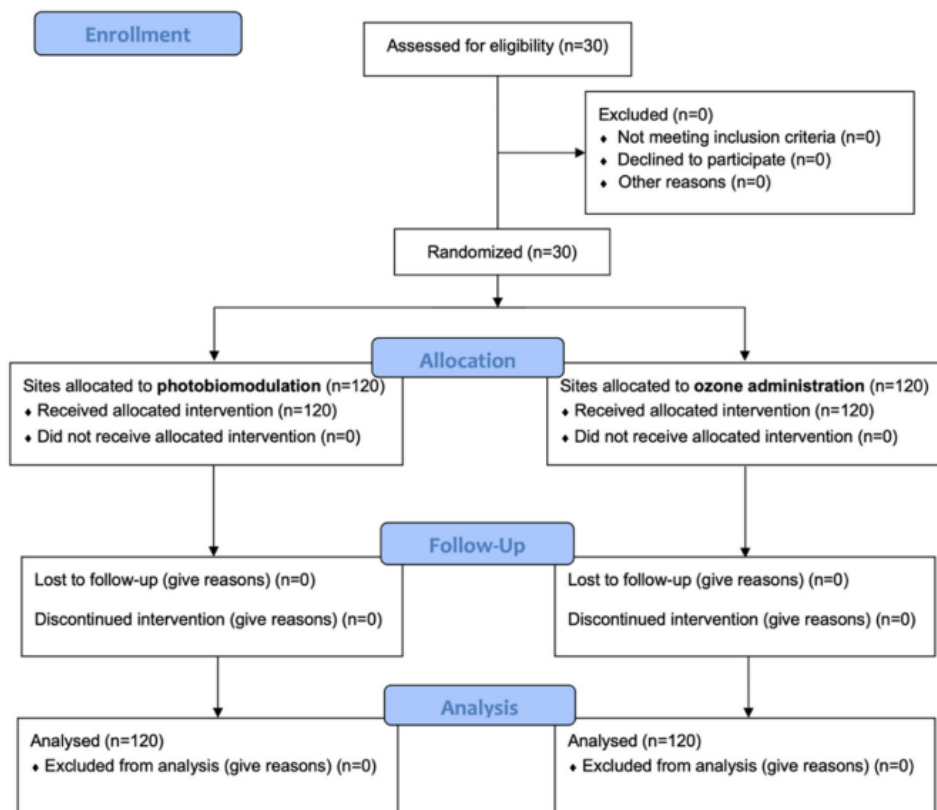
- Effetti collaterali

Nessun effetto collaterale è stato riportato o osservato nei pazienti assegnati ai trattamenti.

## 4.2. Studio per la valutazione dell'efficacia del gel ozonizzato rispetto alla fotomodulazione nel trattamento della malattia parodontale

- Flusso dei partecipanti

La flow chart dello studio è mostrata in figura 6. 30 pazienti rispondenti ai criteri di inclusione sono risultati necessari per la partecipazione allo studio. Tutti i pazienti reclutati hanno acconsentito a partecipare allo studio e hanno ricevuto gli interventi a cui sono stati allocati. Nessun paziente è stato escluso dalle analisi. All'inizio dello studio, il campione riportava un'età media di  $47.1 \pm 13.5$  anni (13 femmine, età media  $45.6 \pm 12.1$ ; 17 maschi, età media  $48.2 \pm 14.7$ ).



**Fig. 6.** Flow-chart CONSORT dello studio [Scribante et al., 2022].

- Reclutamento

I partecipanti sono stati reclutati da luglio 2020 fino a dicembre 2020. Sulla base di un follow up a sei mesi, lo studio è terminato a luglio 2021. Il trial clinico non è terminato né è stato interrotto in anticipo.

- Numeri analizzati

Tutti i pazienti sono stati inclusi nelle analisi statistiche.

- Risultati

*Profondità di sondaggio (PPD)*: i valori di PPD sono mostrati in tabella 15. PPD si è ridotto significativamente da T<sub>0</sub> a T<sub>6</sub> in entrambi i gruppi ( $p<0.05$ ). Una differenza significativa tra i due gruppi risulta evidente a partire da T<sub>5</sub> con i valori di PPD significativamente ridotti nel gruppo trattato con fotobiomodulazione (PBM) rispetto al gruppo trattato con ozono ( $p<0.05$ ). Tale riduzione è emersa anche nel lasso di tempo tra T<sub>5</sub> e T<sub>6</sub> ( $p<0.05$ ) solamente nel gruppo PBM mentre non vi è stata alcuna riduzione significativa nel gruppo trattato con ozono ( $p>0.05$ ).

**Tab. 15.** Statistica descrittiva e inferenziale dell'indice PPD [Scribante et al., 2022].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Significance *
Ozone	T0	5.11	1.07	4.00	5.00	9.00	A
	T1	4.62	0.96	3.00	4.00	9.00	B
	T2	4.46	0.86	3.00	4.00	7.00	B,C
	T3	4.07	0.87	3.00	4.00	7.00	D
	T4	3.82	0.76	2.00	4.00	6.00	D,F
	T5	3.62	0.72	2.00	4.00	6.00	F
PBM	T6	3.54	0.72	2.00	3.00	6.00	F
	T0	5.31	1.02	4.00	5.00	9.00	A
	T1	4.51	0.90	3.00	4.00	7.00	B,C
	T2	4.18	0.85	2.00	4.00	7.00	C,D
	T3	3.85	0.89	2.00	4.00	6.00	D,E
	T4	3.37	0.75	2.00	3.00	6.00	E,F
	T5	2.85	0.66	1.00	3.00	5.00	G
	T6	2.43	0.62	1.00	2.00	3.00	H

\* Means with the same letters are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

*Indice di placca (PI)*: i valori di PI sono mostrati in tabella 16. PI si è ridotto significativamente da T<sub>0</sub> a T<sub>6</sub> in entrambi i gruppi ( $p < 0.05$ ). Sebbene una diminuzione maggiore sia emersa nel gruppo PBM, non sono state rilevate differenze significative nel confronto intergruppo nei vari tempi dello studio ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 16.** Statistica descrittiva e inferenziale dell'indice PI [Scribante et al., 2022].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Significance *
Ozone	T0	71.67	23.54	30.00	80.00	100.00	A
	T1	57.33	18.13	20.00	60.00	80.00	B
	T2	50.87	16.13	20.00	52.50	75.00	B,C
	T3	44.77	15.33	20.00	45.00	70.00	C,D
	T4	41.60	11.97	20.00	41.00	60.00	C,D,E
	T5	37.60	11.03	20.00	38.00	60.00	C,D,E,F
Photobiomodulation	T6	35.13	10.41	20.00	35.00	60.00	D,E,F
	T0	73.17	21.35	40.00	80.00	100.00	A
	T1	57.33	18.13	20.00	60.00	80.00	B
	T2	50.67	15.85	20.00	52.50	75.00	B,C
	T3	43.17	13.93	20.00	42.50	70.00	C,D,E
	T4	37.33	11.50	20.00	32.50	55.00	D,E,F
	T5	30.20	10.48	15.00	30.00	55.00	E,F
	T6	25.17	7.43	13.00	25.00	45.00	F

\* Means with the same letters are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

*Sanguinamento al sondaggio (BoP)*: i valori di PI sono mostrati in tabella 17. BoP si è ridotto significativamente da T<sub>0</sub> a T<sub>6</sub> in entrambi i gruppi ( $p < 0.05$ ). Sebbene una diminuzione maggiore sia emersa nel gruppo PBM, non sono state rilevate differenze significative nel confronto intergruppo nei vari tempi dello studio ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 17.** Statistica descrittiva e inferenziale dell'indice BoP [Scribante et al., 2022].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Significance *
Ozone	T0	71.67	23.54	30.00	80.00	100.00	A
	T1	57.33	18.13	20.00	60.00	80.00	B
	T2	50.87	16.13	20.00	52.50	75.00	B,C
	T3	44.77	15.33	20.00	45.00	70.00	C,D
	T4	41.60	11.97	20.00	41.00	60.00	C,D,E
	T5	37.60	11.03	20.00	38.00	60.00	C,D,E,F
Photobiomodulation	T6	35.13	10.41	20.00	35.00	60.00	D,E,F
	T0	73.17	21.35	40.00	80.00	100.00	A
	T1	57.33	18.13	20.00	60.00	80.00	B
	T2	50.67	15.85	20.00	52.50	75.00	B,C
	T3	43.17	13.93	20.00	42.50	70.00	C,D,E
	T4	37.33	11.50	20.00	32.50	55.00	D,E,F
	T5	30.20	10.48	15.00	30.00	55.00	E,F
	T6	25.17	7.43	13.00	25.00	45.00	F

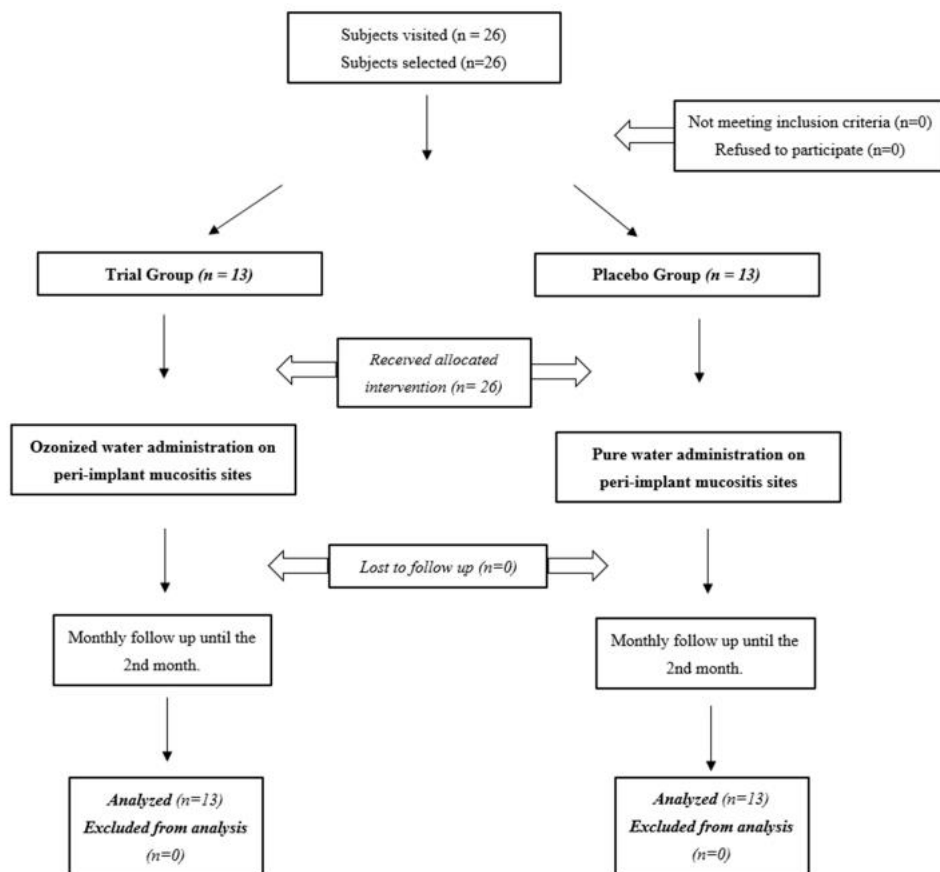
\* Means with the same letters are not significantly different ( $p > 0.05$ ).

#### 4.3. Studio per la valutazione dell'efficacia di acqua ozonizzata nel trattamento della mucosite perimplantare

- Flusso dei partecipanti

La flow chart CONSORT dello studio è mostrata in figura 7. Il gruppo sperimentale è risultato costituito da 7 maschi e 6 femmine di età media pari  $59.9 \pm 7.9$  anni, mentre il gruppo placebo da 5 maschi e 8 femmine di età media pari a  $62.3 \pm 9$  anni.

**Fig. 7.** Flow-chart CONSORT dello studio [Butera et al., 2021].





- Reclutamento

I partecipanti sono stati reclutati da aprile 2021 fino a maggio 2021. Sulla base di un follow up a due mesi, lo studio è terminato a luglio 2021. Il trial clinico non è terminato né è stato interrotto in anticipo.

- Numeri analizzati

Tutti i pazienti sono stati inclusi nelle analisi statistiche.

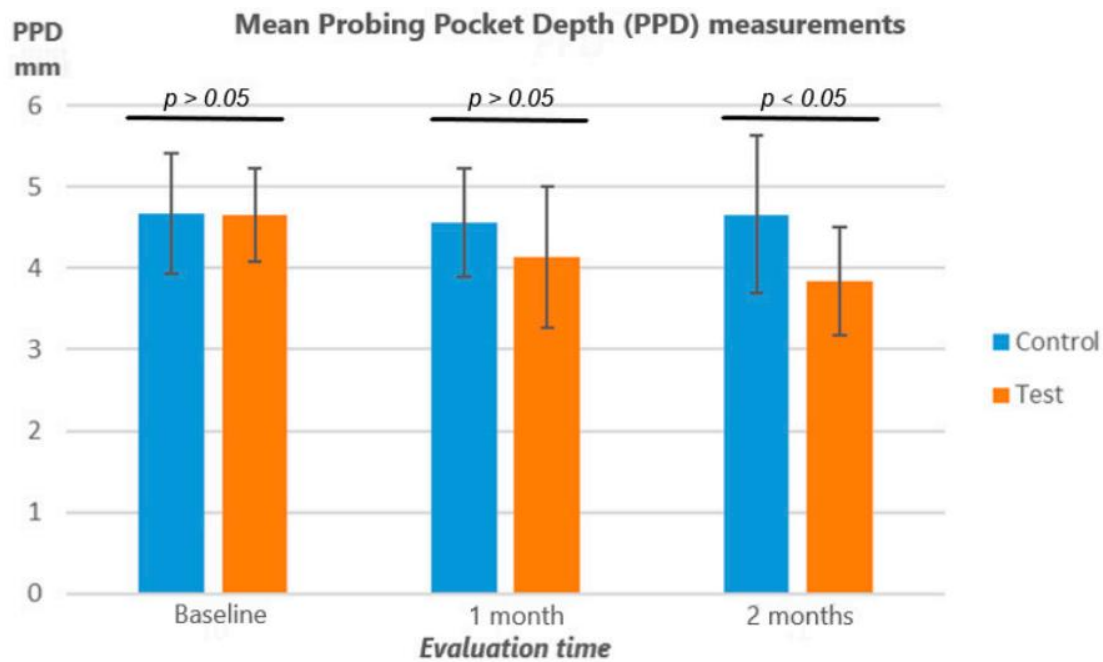
- Risultati

*Profondità di sondaggio (PPD)*: i valori di PPD sono mostrati in tabella 17 e in figura 8. È stata rilevata una riduzione significativa e progressiva nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ), a differenza del gruppo di controllo ( $p > 0.05$ ). Al confronto intergruppo, non sono emerse differenze significative tra gruppo sperimentale e gruppo di controllo a T<sub>0</sub> e a T<sub>1</sub>, mentre una differenza significativa tra i gruppi è risultata a T<sub>2</sub>.

**Tab. 17.** Statistica descrittiva dell'indice PPD [Butera et al., 2021].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Intragroup Differences *	Intergroup Differences †
Trial Group	T0	4.65	0.57	4.00	4.70	5.71	A	T0: ns
	T1	4.14	0.87	3.00	4.00	5.82	B	T1: ns
	T2	3.84	0.67	3.00	3.63	5.24	C	T2: $p < 0.05$
Placebo Group	T0	4.67	0.75	4.00	4.50	6.33	A	
	T1	4.55	0.66	3.33	4.75	5.54	A	
	T2	4.66	0.96	3.25	4.34	6.91	A	

\* Different letters show statistically significant differences among the time frames ( $p < 0.05$ ); † ns = not significant.



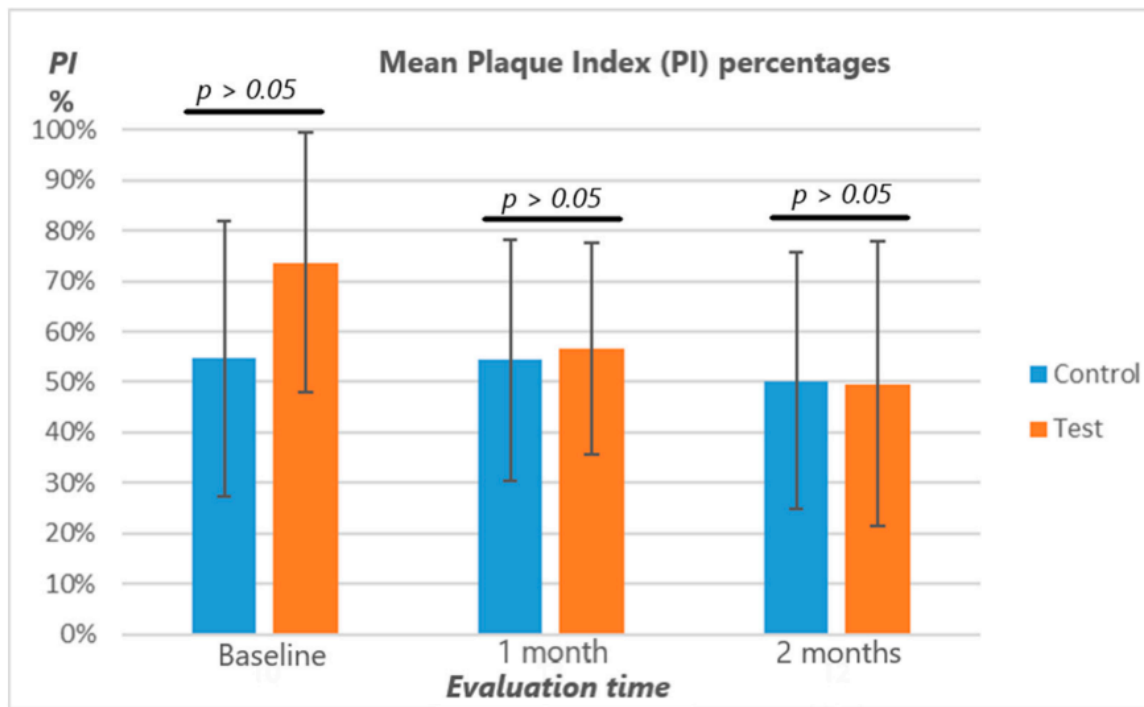
**Fig. 8.** Medie dell'indice PPD (mm): la figura mostra l'assenza di differenze intergruppo ad ogni periodo di valutazione ( $p > 0.05$ ), ad eccezione di T<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). Relativamente alle differenze intragruppo, una riduzione significativa e progressiva dell'indice è stata rilevata nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ) ma non in quello di controllo ( $p > 0.05$ ) [Butera et al., 2021].

*Indice di placca (PI):* i valori di PI sono mostrati in tabella 18 e in figura 9. PI si è ridotto significativamente nel gruppo sperimentale tra T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ ), mentre nessuna variazione è stata rilevata nei follow up successivi ( $p > 0.05$ ). Nel gruppo di controllo, nessuna differenza significativa è stata rilevata durante lo studio ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 18.** Statistica descrittiva dell'indice PI [Butera et al., 2021].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Intragroup Differences *	Intergroup Differences †
Trial Group	T0	73.65	25.67	25.00	75.00	100.00	A	T0: ns
	T1	56.71	21.02	25.00	50.00	100.00	B	T1: ns
	T2	49.68	28.13	0.00	50.00	100.00	B	T2: ns
Placebo Group	T0	54.62	27.38	22.50	50.00	100.00	B	
	T1	54.31	23.86	25.00	50.00	87.50	B	
	T2	50.29	25.54	0.00	50.00	100.00	B	

\* Different letters show statistically significant differences among the time frames ( $p < 0.05$ ); † ns = not significant.



**Fig. 9.** Medie dell'indice PI (%): la figura mostra l'assenza di differenze intergruppo ad ogni periodo di valutazione ( $p > 0.05$ ). Relativamente alle differenze intragruppo, una riduzione significativa dell'indice è stata rilevata nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ) (ad eccezione del periodo tra  $T_1$  e  $T_2$ ) ma non in quello di controllo ( $p > 0.05$ ) [Butera et al., 2021].

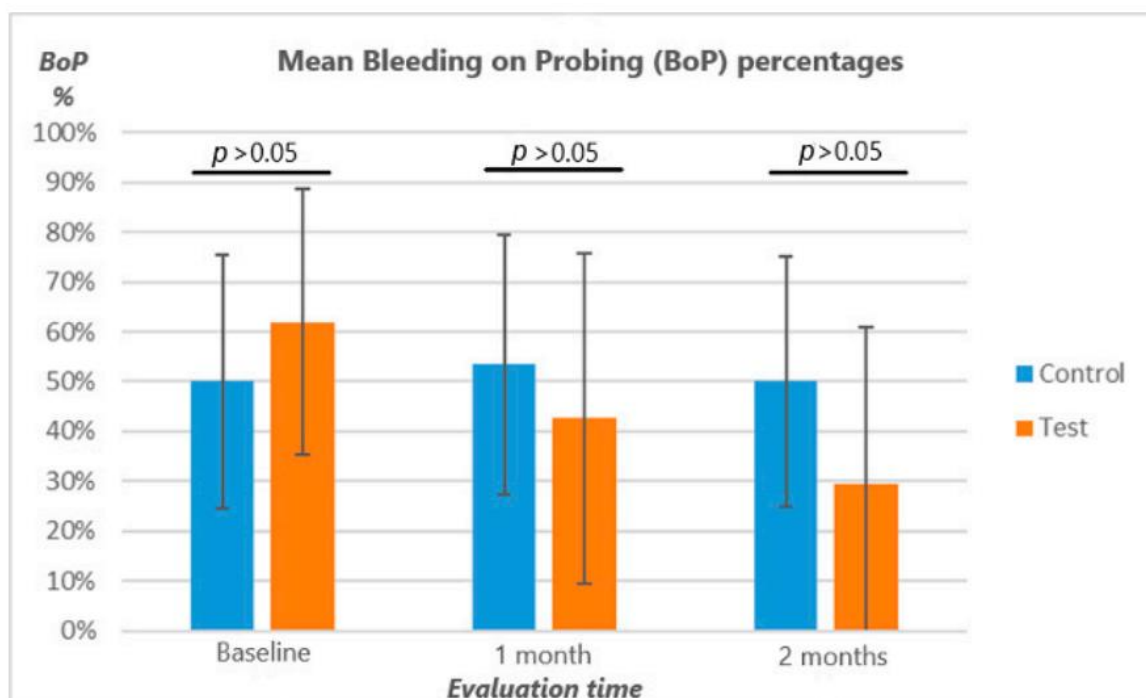
*Sanguinamento al sondaggio (BoP):* i valori di PI sono mostrati in tabella 19 e in figura 10. Le percentuali di BoP si sono ridotte significativamente nel gruppo sperimentale nei

periodi T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub> e T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ ). Nel gruppo di controllo, non è stata rilevata nessuna differenza significativa durante il follow up ( $p > 0.05$ ). Inoltre, nessuna differenza intergruppo è stata rilevata tra i periodi corrispondenti tra i due gruppi ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 19.** Statistica descrittiva dell'indice BoP [Butera et al., 2021].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Intragroup Differences *	Intergroup Differences †
Trial Group	T0	61.96	26.69	16.67	63.33	100.00	A	T0: ns
	T1	42.60	33.15	0.00	33.33	100.00	B	T1: ns
	T2	29.55	31.43	0.00	29.17	100.00	C	T2: ns
Placebo Group	T0	50.14	25.43	16.67	50.00	100.00	D	
	T1	53.46	26.10	16.67	50.00	100.00	D	
	T2	50.00	25.21	15.33	50.00	100.00	D	

\* Different letters show statistically significant differences among the time frames ( $p < 0.05$ ); † ns = not significant.



**Fig. 10.** Medie dell'indice BoP (%): la figura mostra l'assenza di differenze intergruppo ad ogni periodo di valutazione ( $p > 0.05$ ). Relativamente alle differenze intragruppo, una

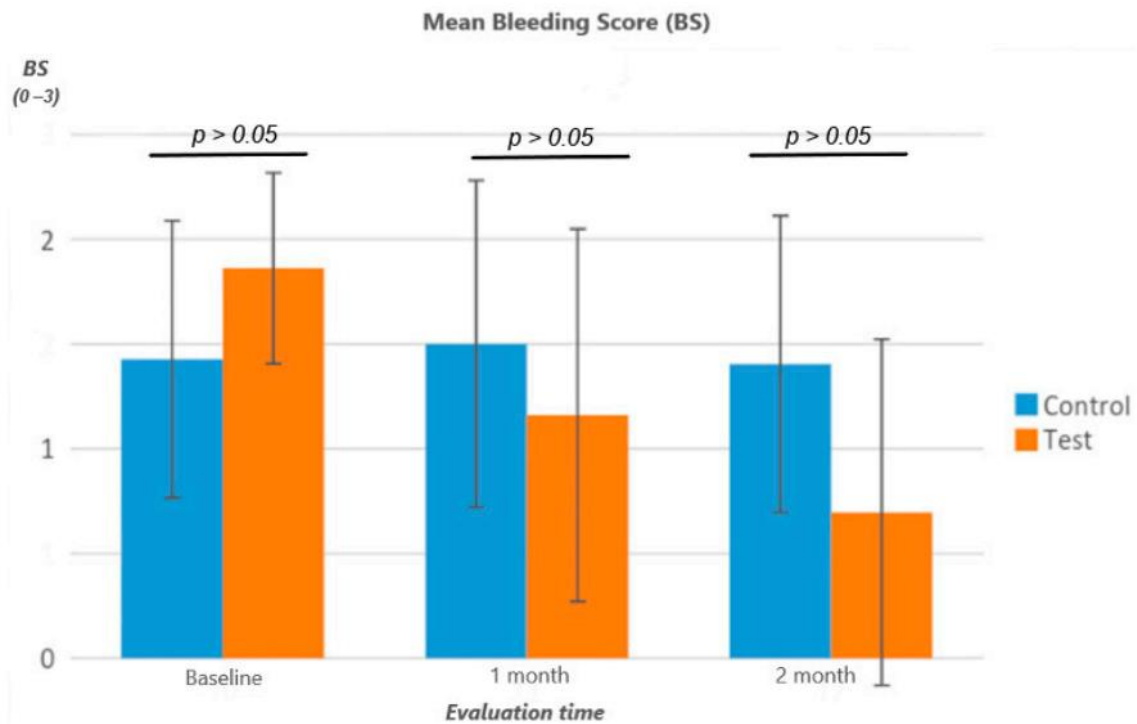
riduzione significativa e progressiva dell'indice è stata rilevata nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ) ma non in quello di controllo ( $p > 0.05$ ) [Butera et al., 2021].

*Indice di sanguinamento (BS)*: i valori di BS sono mostrati in tabella 20 e in figura 21. L'indice di sanguinamento è risultato significativamente diminuito nel gruppo sperimentale tra T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> e tra T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub>. Nessuna differenza intergruppo statisticamente significativa è emersa durante l'intero follow up.

**Tab. 20.** Statistica descrittiva dell'indice BS [Butera et al., 2021].

Group	Time	Mean	St Dev	Min	Median	Max	Intragroup Differences *	Intergroup Differences †
Trial Group	T0	1.86	0.46	1.00	2.00	3.00	A	T0: ns
	T1	1.16	0.89	0.00	1.00	3.00	B	T1: ns
	T2	0.70	0.83	0.00	0.50	3.00	C	T2: ns
Placebo Group	T0	1.43	0.66	0.55	1.25	2.50	D	
	T1	1.50	0.78	0.60	1.25	3.00	D	
	T2	1.40	0.71	0.50	1.21	3.00	D	

\* Different letters show statistically significant differences among the time frames ( $p < 0.05$ ); † ns = not significant.

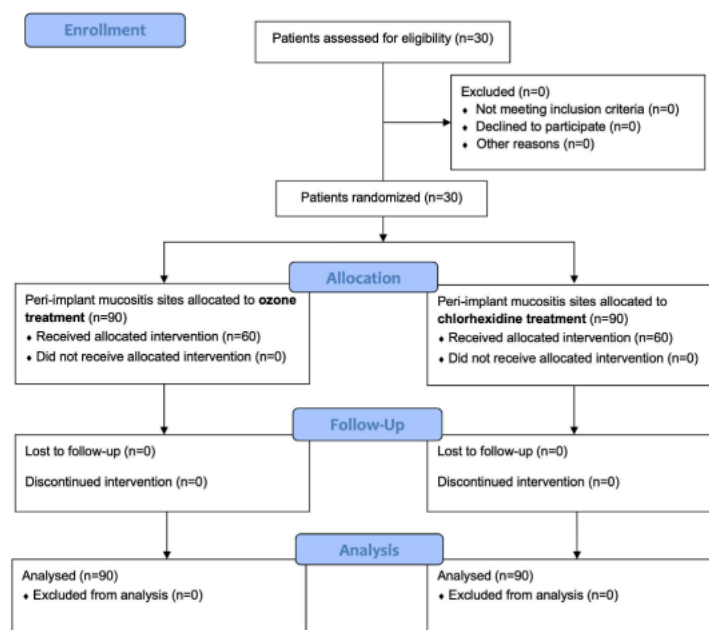


**Fig. 11.** Medie dell'indice BS (0-3): la figura mostra l'assenza di differenze intergruppo ad ogni periodo di valutazione ( $p > 0.05$ ). Relativamente alle differenze intragruppo, una riduzione significativa e progressiva dell'indice è stata rilevata nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ) ma non in quello di controllo ( $p > 0.05$ ) [Butera et al., 2021].

#### 4.4. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato rispetto a gel di clorexidina nel trattamento della mucosite perimplantare

- Flusso dei partecipanti e caratteristiche basali

I pazienti sono stati arruolati fino a quando il numero di siti di mucosite perimplantare richiesto dal calcolo della numerosità campionaria è stato raggiunto. In totale, 30 pazienti sono stati arruolati nello studio sulla base dei criteri di inclusione. Tutti i pazienti hanno acconsentito a partecipare allo studio e ad essere allocati al rispettivo intervento. Nessun paziente è stato escluso dalle analisi. La flow chart CONSORT dello studio è mostrata in figura 12.



**Fig. 12.** Flow-chart CONSORT dello studio [Butera et al., 2023].

- Caratteristiche basali

All'inizio dello studio ( $T_0$ ), i 30 partecipanti dello studio (14 femmine e 16 maschi) hanno riportato un'età media pari a  $59.9 \pm 7.9$  anni ( $58.94 \pm 9.38$  anni per le femmine,  $59.14$

$\pm 7.25$  per i maschi).

- Risultati

*Profondità di sondaggio (PPD)*: i valori di PPD sono mostrati in tabella 21. È stata rilevata una riduzione significativa e progressiva da T<sub>0</sub> a T<sub>3</sub> in entrambi i gruppi ( $p < 0.05$ ). Al confronto intergruppo, non sono emerse differenze significative tra gruppo sperimentale e gruppo di controllo ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 21.** Statistica descrittiva dell'indice PPD [Butera et al., 2023].

Group	Time	Mean	St. Dev.	Min.	Median	Max.	Significance *
Control (Chlorhexidine)	T0	6.55	1.18	5.00	6.00	10.00	A
	T1	5.22	1.17	3.00	5.00	8.00	B
	T2	4.49	1.16	2.00	4.00	7.00	C
	T3	4.23	1.13	2.00	4.00	7.00	D, E
Trial (Ozonized oil-based gel)	T0	6.80	1.21	5.00	7.00	9.00	A
	T1	5.38	1.36	3.00	5.00	9.00	B
	T2	4.41	1.40	2.00	4.00	9.00	C, D
	T3	3.92	1.42	2.00	4.00	8.00	E

\* Means with same letters do not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

*Indice di placca (PI)*: i valori di PI sono mostrati in tabella 22. È stata rilevata una riduzione significativa in entrambi i gruppi tra T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ ). Al confronto intergruppo, è emersa una differenza statisticamente significativa a T<sub>2</sub> con valori inferiori nel gruppo trattato con gel ozonizzato ( $p < 0.05$ ).



**Tab. 22.** Statistica descrittiva dell'indice PI [Butera et al., 2023].

Group	Time	Mean	St. Dev.	Min.	Median	Max.	Significance *
Control (Chlorhexidine)	T0	84.93	16.74	45.00	89.50	100.00	A
	T1	49.93	18.03	20.00	46.50	100.00	B
	T2	50.13	16.45	15.00	46.50	88.00	B
	T3	47.20	19.43	15.00	42.00	81.00	B, C
Trial (Ozonized oil-based gel)	T0	84.27	16.24	45.00	87.50	100.00	A
	T1	48.63	18.43	20.00	44.00	100.00	B, C
	T2	45.10	18.23	0.00	43.00	79.00	C
	T3	42.03	21.13	0.00	41.00	83.00	C

\* Means with same letters do not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

*Sanguinamento al sondaggio (BoP)*: i valori di PI sono mostrati in tabella 23. È stata rilevata una riduzione significativa in entrambi i gruppi, in particolare tra T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub> e tra T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> nel gruppo di controllo ( $p < 0.05$ ) e durante l'intero follow up nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ). Al confronto intergruppo, è emersa una differenza statisticamente significativa tra i gruppi a T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub> ( $p < 0.05$ ).

**Tab. 23.** Statistica descrittiva dell'indice BoP [Butera et al., 2023].

Group	Time	Mean	St. Dev.	Min.	Median	Max.	Significance *
Control (Chlorhexidine)	T0	44.62	26.94	8.33	44.00	100.00	A
	T1	27.07	17.24	0.00	23.68	55.00	B
	T2	18.38	12.32	1.19	19.34	40.25	C
	T3	18.57	15.86	1.10	18.00	83.30	B, C, D
Trial (Ozonized oil-based gel)	T0	46.14	27.09	5.95	42.54	100.00	A
	T1	21.72	13.66	0.00	21.00	48.00	C
	T2	13.31	9.12	0.00	11.95	37.10	D
	T3	9.95	7.17	0.00	10.00	29.40	E

\* Means with same letters do not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

*Indice di suppurazione (SI)*: i valori di SI sono mostrati in tabella 24. È stata rilevata una riduzione significativa in entrambi i gruppi, in particolare nell'intervallo T<sub>2</sub>-T<sub>3</sub> nel gruppo di controllo e nell'intervallo T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ). Al confronto intergruppo, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 24.** Statistica descrittiva dell'indice SI [Butera et al., 2023].

Group	Time	Mean	St. Dev.	Min.	Median	Max.	Significance *
Control (Chlorhexidine)	T0	0.16	0.37	0.00	0.00	1.00	A, B
	T1	0.13	0.34	0.00	0.00	1.00	A, B, C
	T2	0.05	0.23	0.00	0.00	1.00	B, C
	T3	0.04	0.20	0.00	0.00	1.00	C
Trial (Ozonized oil-based gel)	T0	0.17	0.38	0.00	0.00	1.00	A
	T1	0.07	0.26	0.00	0.00	1.00	A, C
	T2	0.04	0.19	0.00	0.00	1.00	C
	T3	0.02	0.16	0.00	0.00	1.00	C

\* Means with same letters do not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

*Indice di sanguinamento (BS)*: i valori di BS sono mostrati in tabella 25. È stata rilevata una riduzione significativa in entrambi i gruppi, in particolare nell'intervallo T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> nel gruppo di controllo e negli intervalli T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub> e T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> nel gruppo sperimentale ( $p < 0.05$ ). Al confronto intergruppo, è emersa una differenza significativa tra i due gruppi a T<sub>2</sub> e a T<sub>3</sub> ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 25.** Statistica descrittiva dell'indice BS [Butera et al., 2023].

Group	Time	Mean	St. Dev.	Min.	Median	Max.	Significance *
Control (Chlorhexidine)	T0	2.13	0.66	1.00	2.00	3.00	A
	T1	1.81	0.75	0.00	2.00	3.00	A, B
	T2	1.56	0.76	0.00	2.00	3.00	B, C
	T3	1.31	0.68	0.00	1.00	2.00	C, D
Trial (Ozonized oil-based gel)	T0	2.05	0.71	1.00	2.00	3.00	A
	T1	1.64	0.94	0.00	2.00	7.00	B, C
	T2	1.17	0.70	0.00	1.00	3.00	D, E
	T3	0.85	0.67	0.00	1.00	2.00	E

\* Means with same letters do not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

*Stato della mucosa marginale (MMC)*: i valori dell'indice MMC sono riportati in tabella 26. È stata rilevata una riduzione significativa in entrambi i gruppi nell'intervallo T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub> ( $p < 0.05$ ). Al confronto intergruppo, non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 26.** Statistica descrittiva dell'indice MMC [Butera et al., 2023].

Group	Time	Mean	St. Dev.	Min.	Median	Max.	Significance *
Control (Chlorhexidine)	T0	2.29	0.49	1.00	2.00	3.00	A
	T1	1.63	0.75	0.00	2.00	3.00	B
	T2	1.32	0.60	0.00	1.00	2.00	B, C, D
	T3	1.09	0.68	0.00	1.00	2.00	D
Trial (Ozonized oil-based gel)	T0	2.27	0.47	1.00	2.00	3.00	A
	T1	1.61	0.71	1.00	1.00	3.00	B, C
	T2	1.22	0.63	0.00	1.00	2.00	C, D
	T3	0.96	0.72	0.00	1.00	2.00	D

\* Means with same letters do not show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

#### 4.5. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nello sbiancamento di resine dentali composite pigmentate con clorexidina

I dati relativi alle variabili E\*, L\*, a\* e b\* nei due gruppi e nei quattro sottogruppi sono mostrati nelle tabelle 27-31.

**Tab. 27.** Statistica descrittiva per i valori E\*, L\*, a\* e b\* per i due gruppi nei vari tempi sperimentali [Gallo et al., 2023].

Group		E	L	A	B
Group A—Corsodyl	T0	4.61 (3.7; 5.8)	−4.08 (−5.6; 4)	−0.73 (−1.8; −0.6)	−1.04 (−2.5; −0.1)
	T1	5.99 (5.2; 6.9)	−5.93 (−6.9; −5.2)	−2.12 (−3.8; −1.2)	0.61 (−1.6; 2)
	T2	4.88 (3.8; 5.8)	−4.77 (−5.8; −3.7)	−0.39 (−1.9; 2)	−1.23 (−2.5; 0)
Group B—Control	T0	4.25 (3.6; 5.1)	−4.21 (−4.9; −3.6)	0.31 (−1.4; 1.1)	−0.85 (−1.8; 1.3)
	T1	4.61 (3.8; 5.1)	−4.61 (−5.1; −3.8)	−0.17 (−1.3; 1.3)	−0.62 (−1.4; 0.5)
	T2	5.27 (4.8; 6.1)	−5.27 (−6.1; −4.8)	0.39 (−0.5; 1.3)	−0.04 (−1.5; 1.3)

**Tab. 28.** Statistica descrittiva per il valore E\* nei sottogruppi nei vari tempi sperimentali [Gallo et al., 2023].

	Mean	SD	Min	Mdn	Max	Significance *
Control T0	4.56	0.36	4.20	4.50	5.10	A
Control T1	6.08	0.22	5.80	6.00	6.30	B
Control T2	5.48	0.41	4.80	5.70	5.80	A
Ozonized Gel T0	4.00	0.37	3.70	4.00	4.60	A
Ozonized Gel T1	5.82	0.49	5.20	5.80	6.40	B
Ozonized Gel T2	4.48	0.47	3.80	4.70	4.90	A
Ozonized Oil T0	4.86	0.65	3.80	4.90	5.40	A
Ozonized Oil T1	6.24	0.42	5.90	6.10	6.90	B
Ozonized Oil T2	4.94	0.57	4.40	4.90	5.70	A
Ozonized Oil + Regen T1	5.02	0.51	4.40	4.90	5.80	B
Ozonized Oil + Regen T2	5.82	0.37	5.20	5.90	6.10	B
Ozonized Oil + Regen T3	4.62	0.41	4.00	4.90	4.90	B

\* Different letters show a statistically significant difference between the groups ( $p < 0.05$ ).

**Tab. 29.** Statistica descrittiva per il valore L\* nei sottogruppi nei vari tempi sperimentali [Gallo et al., 2023].

	Mean	SD	Min	Mdn	Max	Significance *
Control T0	-4.48	0.40	-5.10	-4.40	-4.10	A
Control T1	-5.92	0.22	-6.20	-5.80	-5.70	A
Control T2	-5.44	0.40	-5.80	-5.60	-4.80	A
Ozonized Gel T0	-2.36	3.57	-4.40	-3.70	4.00	B
Ozonized Gel T1	-5.72	0.44	-6.40	-5.70	-5.20	A
Ozonized Gel T2	-4.32	0.48	-4.80	-4.20	-3.70	A
Ozonized Oil T0	-4.68	0.56	-5.20	-4.80	-3.80	A
Ozonized Oil T1	-6.22	0.43	-6.90	-6.00	-5.90	A
Ozonized Oil T2	-4.78	0.48	-5.50	-4.80	-4.30	A
Ozonized Oil + Regen T1	-4.82	0.48	-5.60	-4.80	-4.30	A
Ozonized Oil + Regen T2	-5.88	0.37	-6.20	-5.90	-5.30	A
Ozonized Oil + Regen T3	-3.02	3.82	-5.00	-4.80	3.80	A

\* Different letters show a statistically significant difference between the groups ( $p < 0.05$ ).

**Tab. 30.** Statistica descrittiva per il valore a\* nei sottogruppi nei vari tempi sperimentali [Gallo et al., 2023].

	Mean	SD	Min	Mdn	Max	Significance *
Control T0	-0.32	0.11	-0.40	-0.40	-0.20	A
Control T1	-2.38	1.07	-3.80	-2.00	-1.30	A
Control T2	-0.34	1.40	-1.60	-0.80	2.00	A
Ozonized Gel T0	-0.18	0.73	-1.00	-0.20	0.60	A
Ozonized Gel T1	-2.08	0.40	-2.60	-2.10	-1.60	A
Ozonized Gel T2	-0.16	1.13	-1.90	0.40	0.70	A
Ozonized Oil T0	-0.96	0.71	-1.70	-1.30	-0.20	A
Ozonized Oil T1	-1.96	0.61	-2.80	-1.90	-1.30	A
Ozonized Oil T2	-0.74	0.89	-1.80	-0.80	0.60	A
Ozonized Oil + Regen T1	-1.48	0.43	-1.80	-1.70	-0.80	A
Ozonized Oil + Regen T2	-2.06	0.59	-2.60	-2.10	-1.20	A
Ozonized Oil + Regen T3	-0.34	0.95	-1.60	0.10	0.50	A

\* Different letters show a statistically significant difference between the groups ( $p < 0.05$ ).

**Tab. 31.** Statistica descrittiva per il valore b\* nei sottogruppi nei vari tempi sperimentali  
[Gallo et al., 2023].

	Mean	SD	Min	Mdn	Max	Significance *
Control T0	-0.54	0.28	-0.80	-0.60	-0.20	A
Control T1	0.74	0.88	-0.40	0.50	2.00	A
Control T2	-0.92	0.82	-2.10	-1.00	0.00	A
Ozonized Gel T0	-0.70	0.54	-1.40	-0.60	-0.10	A
Ozonized Gel T1	0.40	1.26	-1.60	1.00	1.60	A
Ozonized Gel T2	-1.34	0.35	-1.70	-1.50	-0.80	A
Ozonized Oil T0	-1.42	0.75	-2.50	-1.60	-0.70	A
Ozonized Oil T1	0.72	0.63	0.00	0.70	1.40	A
Ozonized Oil T2	-1.42	0.79	-2.50	-1.30	-0.50	A
Ozonized Oil + Regen T1	-1.50	0.57	-1.80	-1.80	-0.50	A
Ozonized Oil + Regen T2	0.58	0.65	-0.10	0.30	1.50	A
Ozonized Oil + Regen T3	-1.24	0.48	-1.90	-1.00	-0.80	A

\* Different letters show a statistically significant difference between the groups ( $p < 0.05$ ).

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i 40 campioni a T<sub>0</sub>. I 20 campioni del gruppo A, esposti alla sostanza colorante, hanno subito una variazione del colore da T<sub>0</sub> a T<sub>1</sub>, mentre i 20 campioni esposti alla soluzione fisiologica non hanno subito alcuna variazione di colore statisticamente significativa.

Relativamente alla variabile E\*, un aumento significativo è stato rilevato a T<sub>1</sub> nel gruppo di controllo, nel gruppo trattato con gel ozonizzato, nel gruppo trattato con olio ozonizzato, e in ogni tempistica nel gruppo trattato con l'olio ozonizzato e sostanza rigenerante (mirra).

Relativamente alla variabile L\*, nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata ai vari tempi tra i sottogruppi, ad eccezione per il gruppo trattato con olio ozonizzato a T<sub>0</sub>.

In tutti i sottogruppi non è stata rilevata alcuna differenza statisticamente significativa ai vari tempi di analisi per i valori a\* e b\*.

#### 4.6. Studio per la valutazione dell'efficacia di un gel ozonizzato nello sbiancamento di resine dentali composite pigmentate con clorexidina

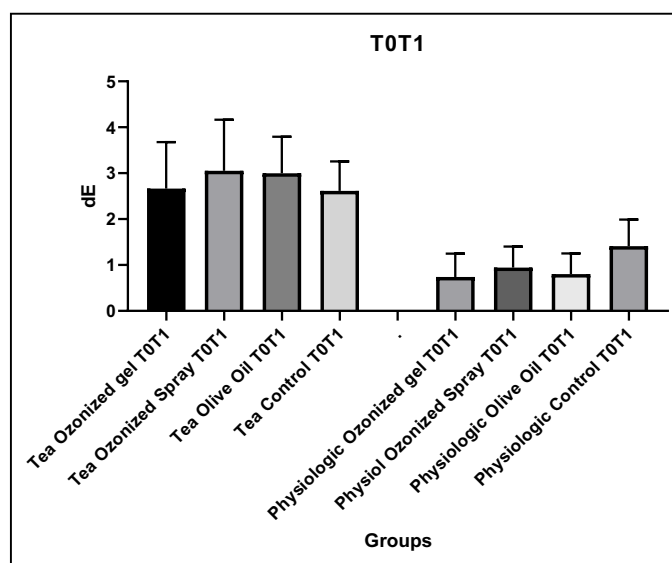
Le tabelle 32-33 e le figure 13-14 mostrano i dati relativi alle variazioni di colore ( $\Delta E$ ) tra  $T_0$  e  $T_1$  e tra  $T_1$  e  $T_2$ .

Nel periodo  $T_0 - T_1$ , non sono state rilevate variazioni di colore significative né nel gruppo esposto alla colorazione con tè, né nel gruppo i cui campioni sono stati conservati in soluzione fisiologica confrontando le sostanze ozonizzate il sottogruppo di controllo ( $p > 0.05$ ).

**Tab. 32.** Statistica descrittiva per il valore  $\Delta E$  (variazione di colore) nei due gruppi nella tempistica  $T_0 - T_1$ .

	Mean	SD	Min	Median	Max	Significance*
Tea + Ozonized gel	2.66	1.01	1.39	2.75	3.77	A
Tea + Regenerative Ozonized Oil	3.05	1.11	1.27	3.18	4.13	A
Tea + Olive Oil	3.00	0.80	2.46	2.65	4.48	A
Tea (Control)	2.61	0.64	1.80	3.00	3.26	A
Physiologic water + Ozonized gel	0.74	0.51	0.24	0.52	1.64	B
Physiologic water + Regenerative Ozonized Oil	0.94	0.46	0.50	0.86	1.64	B
Physiologic water + Olive Oil	0.80	0.45	0.33	0.64	1.46	B
Physiologic water (Control)	1.41	0.58	0.64	1.49	2.32	B

\*A statistically significant difference between the groups is represented by different letters ( $p < 0.05$ )



**Fig. 13.** Variazione di colore ( $\Delta E$ ) nei gruppi nel lasso di tempo  $T_0 - T_1$ .

Nel periodo  $T_1 - T_2$ , è stata rilevata una variazione di colore significativa sia nel gruppo esposto alla colorazione con tè sia nel gruppo i cui campioni sono stati conservati in soluzione fisiologica ( $p < 0.05$ ). In entrambi i gruppi, la variazione di colore è risultata maggiore con l'utilizzo del gel ozonizzato.

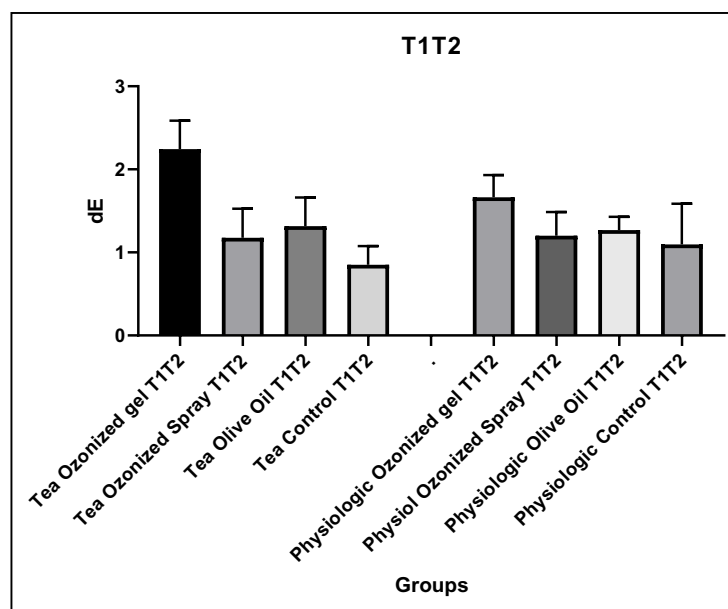
Non sono state rilevate differenze significative in nessun gruppo tra il sottogruppo di controllo e i sottogruppi esposti rispettivamente all'applicazione di olio ozonizzato contenente una sostanza rigenerante (mirra) e all'olio di oliva ( $p > 0.05$ ).



**Tab. 33.** Statistica descrittiva per il valore  $\Delta E$  (variazione di colore) nei due gruppi  
nella tempistica  $T_1 - T_2$ .

	Mean	SD	Min	Median	Max	Significance*
Tea + Ozonized gel	2.41	1.50	0.68	2.15	4.95	A
Tea + Regenerative Ozonized Oil	1.18	0.35	0.84	0.94	1.59	B
Tea + Olive Oil	1.47	0.84	0.71	1.17	2.88	B
Tea (Control)	0.85	0.23	0.54	0.91	1.11	B
Physiologic water + Ozonized gel	1.85	1.33	0.54	1.42	3.64	C
Physiologic water + Regenerative Ozonized Oil	1.20	0.28	0.91	1.08	1.62	B
Physiologic water + Olive Oil	1.40	0.84	0.22	1.54	2.24	B
Physiologic water (Control)	1.27	1.05	0.30	0.84	2.96	B

\*A statistically significant difference between the groups is represented by different letters ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 14.** Variazione di colore ( $\Delta E$ ) nei gruppi nel lasso di tempo  $T_1 - T_2$ .

## **5. DISCUSSIONE**

Il trattamento di Scaling e Root Planing (SRP) rappresenta la terapia gold standard per il trattamento della malattia parodontale e perimplantare, in aggiunta all'utilizzo di agenti antibiotici e/o antisettici [Colombo et al., 2021]. Al fine di proporre nuovi agenti chimici per il trattamento di tali patologie, l'obiettivo di questi studi è stato quello di valutare l'efficacia dell'applicazione sottogengivale di sostanze ozonizzate in differenti formulazioni (gel ozonizzato, gas ozonizzato, acqua ozonizzata) rispetto a trattamenti di controllo. L'ozono è un agente antimicrobico a largo spettro le cui applicazioni mediche negli ultimi anni sono aumentate fino a riguardare anche l'ambito odontoiatrico, in particolare per quanto riguarda le patologie gengivali [Gallo and Scribante, 2021].

Il primo studio è stato condotto per valutare il trattamento della malattia parodontale attraverso l'utilizzo di un gel ozonizzato. I dati hanno mostrato un miglioramento significativo di tutti gli indici testati (PPD, CAL, GI, Pi, BoP) a distanza di uno e tre mesi dal tempo iniziale. Il protocollo sperimentale basato sulla combinazione della terapia con ozono con la terapia SRP convenzionale sembra quindi essere una valida opzione per il trattamento non chirurgico della malattia parodontale. Il miglioramento di tutti gli indici clinici a seguito del trattamento SRP seguito dalle applicazioni sottogengivali di ozono potrebbe essere dovuto agli effetti antimicrobici di tale sostanza ossidante [Scassellati et al., 2020]. Inoltre, quest'ultima è in grado di indurre il rilascio di fattori di crescita, di comportare una modulazione vascolare, di stimolare il sistema immunitario e di attivare meccanismi antiinfiammatori se somministrata a basse dosi [Bocci et al., 2008]. In particolare, la riduzione dell'indice BoP nei quadranti trattati con gel ozonizzato potrebbe essere dovuto non solo all'effetto antimicrobico, come riportato anche per la clorexidina, ma soprattutto per l'azione antinfiammatoria e antiossidante. Relativamente al

miglioramento degli indici PPD e CAL, tale effetto potrebbe essere dovuto ad una riparazione del tessuto connettivo riconducibile all'azione stimolante dell'ozono verso i fibroblasti e, inoltre, all'aumentata angiogenesi con rivascolarizzazione del tessuto gengivale. Nonostante ciò, i risultati ottenuti in questo studio non hanno mostrato differenze intergruppo significative per gli indici testati confrontando il gruppo trattato con ozono e quello trattato con clorexidina. Il miglioramento ottenuto a distanza di 1 mese e di 3 mesi tramite trattamento con SRP + ozono è risultato analogo a quello a seguito di terapia con SRP + clorexidina. Inoltre, quest'ultimo trattamento si è rivelato più efficace nella riduzione degli indici CAL e GI a 3 mesi.

Precedenti studi in letteratura sono stati condotti per confrontare l'efficacia di prodotti ozonizzati e a base di clorexidina nel trattamento della malattia parodontale; i risultati della presente ricerca concordano con la maggior parte di questi studi che confermano un certo miglioramento derivante dall'ozono rispetto alla clorexidina [Kaur et al., 2019]. In altri casi, sono stati riportati miglioramenti di maggior rilevanza a seguito di trattamento parodontale con ozonoterapia [Kshitish and Laxman, 2010; Gandhi et al., 2019]. I risultati della revisione sistematica di Moraschini et al. [Moraschini et al., 2020] non supportano comunque il ricorso all'ozonoterapia per il trattamento parodontale non chirurgico.

Merita comunque di essere considerato il fatto che la clorexidina è associata a maggior effetti citotossici oltre ad un rischio di pigmentazione degli elementi dentali e di sviluppo di disgeusia se utilizzato per periodi prolungati [Huth et al., 2006]. Pertanto, sebbene la clorexidina sia un prodotto più economico, il ricorso all'ozonoterapia nella pratica clinica potrebbe essere giustificato considerati gli effetti positivi di tale sostanza e l'assenza degli effetti collaterali tipicamente collegati alla clorexidina. Una limitazione di questo studio, tuttavia, è legata al fatto che sono stati presi in considerazione solamente parametri clinici

e, inoltre, il follow up considerato risulta di breve durata. Infine, considerando la validità esterna dei risultati dello studio, l'efficacia dell'ozono non può essere generalizzata ad altri stadi/gradi di parodontite [Colombo et al., 2021].

Il secondo studio è stato condotto al fine di valutare l'efficacia dell'ozonoterapia tramite gas ozonizzato rispetto alla fotobiomodulazione, in aggiunta al trattamento con SRP, nel miglioramento degli indici clinici parodontali (PPD, BS, PI). Sulla base dei risultati ottenuti, sia l'ozono sia la fotobiomodulazione hanno mostrato una riduzione dei tre indici sopracitati, generalmente con una riduzione significativa e progressiva dall'inizio fino al termine dello studio. Non sono state invece rilevate differenze significative intergruppo per PI e BoP, al contrario i valori di PPD sono risultati significativamente differenti tra i gruppi a partire dal quinto mese di trattamento, con una riduzione significativamente superiore per i siti trattati con fotobiomodulazione. In aggiunta, considerando il periodo tra il quinto e il sesto mese di follow up, nessuna ulteriore riduzione significativa è stata rilevata per l'indice PPD nei siti trattati con ozono, a differenza di quelli trattati con la fotobiomodulazione [Scribante et al., 2022]. Sulla base dei risultati ottenuti nello studio, sia l'ozono sia la fotobiomodulazione appaiono come validi trattamenti adiuvanti per la terapia SRP. Nessuna differenza significativa è stata rilevata tra le due modalità di trattamento, ad eccezione di una riduzione del BoP superiore nel lungo termine per la terapia con fotobiomodulazione. Nonostante i risultati positivi per la terapia con fotobiomodulazione rilevati nel presente studio, così come in studi precedenti [Meimandi et al., 2017; Merigo et al., 2019; Caruso et al., 2008; Özberk et al., 2020; Yilmaz et al., 2013], nessuna evidenza conclusiva è stata riportata per la terapia con fotobiomodulazione. Sulla base di recenti revisioni sistematiche della letteratura [Ren et

al., 2017; Dalvi et al., 2021], mancano informazioni sufficienti relativamente alla dosimetria da adottare per la terapia con fotobiomodulazione, parametro fondamentale per stabilire dei protocolli standardizzati, e quindi replicabili, da adottare sia nell'ambito terapeutico sia in quello sperimentale. Tale problematica deriva dalle differenze sostanziali nelle metodologie e dall'alto rischio di bias degli studi inclusi; pertanto, non è possibile giungere a conclusioni definitive a seguito del confronto tra la terapia con fotobiomodulazione e quella a base di ozono per il trattamento della patologia parodontale [Scribante et al., 2022].

Il terzo studio è stato condotto per valutare l'efficacia dell'ozonoterapia, somministrata sotto forma di acqua ozonizzata, non nella gestione della malattia parodontale bensì della mucosite perimplantare. Quest'ultima condizione consiste in una lesione infiammatoria della mucosa che circonda gli impianti dentali in assenza di perdita di supporto osseo perimplantare [Berglundh et al., 2008]. Tale situazione si verifica sempre più spesso considerando che, al giorno d'oggi, il ricorso alla terapia implantoprotesica è sempre più frequente per la risoluzione di casi di edentulismo totale o parziale. Sulla base dei risultati ottenuti, l'applicazione di acqua ozonizzata è risultata valida nella riduzione degli indici PPD, PI, BoP e BS, con un miglioramento di tali parametri progressivo dall'inizio dello studio ai due mesi successivi ad eccezione di PI tra il primo e il secondo mese di follow up. Al contrario, nessun miglioramento è emerso nel gruppo di controllo il cui trattamento è stato rappresentato dalla somministrazione di acqua pura non ozonizzata. Pertanto, l'ozono ha riportato un effetto benefico sullo stato perimplantare a differenza, come prevedibile, dell'acqua pura. Nonostante questo risultato apparentemente positivo per l'acqua ozonizzata, l'evidenza derivante dal confronto intergruppo sembra andare in

un'altra direzione. Infatti, nessuna differenza significativa è emersa confrontando ogni tempistica nei due gruppi, ad eccezione per l'indice PPD a due mesi. Solo in quest'ultimo caso, infatti, l'acqua ozonizzata ha riportato un effetto clinico significativamente superiore rispetto al controllo. Pertanto, sulla base di tali risultati, è possibile affermare che l'acqua ozonizzata ha migliorato tutti gli indici clinici testati mentre l'acqua pura non ha avuto alcuna influenza sullo stato parodontale, tuttavia, ad eccezione per la maggior riduzione dell'indice PPD a 2 mesi, nessuna azione rilevante è stata notata per l'ozonoterapia su siti perimplantari affetti da mucosite. In aggiunta a ciò, è importante considerare che una differenza significativa dell'indice PPD non corrisponde direttamente a differenze significative sul piano clinico. Infatti PPD, come gli altri indici considerati, non correla con la sopravvivenza a lungo termine degli impianti [Butera et al., 2021]. Relativamente alla valutazione dell'efficacia dell'ozonoterapia nel trattamento della mucosite perimplantare, è stato condotto da McKenna et al. [McKenna et al., 2013] un trial clinico randomizzato controllato per confrontare gli effetti delle applicazioni sottogengivali di ozono e/o perossido di idrogeno nei siti affetti da mucosite perimplantare. I seguenti trattamenti sono stati assegnati in maniera randomizzata per 60 secondi (come nel presente studio) al giorno 0, 7 e 14 ai siti affetti da infiammazione perimplantare: (1), O<sub>2</sub> and 0.9% NaCl (gruppo di controllo), (2) O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), (3) O<sub>3</sub> and 0.9% NaCl, e (4) O<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%). Al tempo zero e durante i due successivi follow up sono stati registrati gli indici PI, GI e BI. Gli autori hanno rilevato che entrambi i trattamenti che includevano l'applicazione di ozono hanno comportato un miglioramento degli indici di salute gengivale e hanno controllato ugualmente il sanguinamento in maniera superiore rispetto al terzo protocollo sperimentale. L'utilizzo dell'ozono è stato valutato in letteratura soprattutto come trattamento adiuvante nel

trattamento chirurgico della perimplantite, la forma irreversibile di infiammazione in corrispondenza di siti perimplantari; nello studio di Isler et al. [Isler et al., 2018], 41 pazienti sono stati allocati in maniera randomizzata ad una decontaminazione della superficie implantare attraverso acqua fisiologica sterile con ozono o al gruppo di controllo con sola acqua fisiologica sterile. Secondo gli Autori, l'utilizzo addizionale della terapia a base di ozono in aggiunta all'SRP ha comportato un miglioramento significativo sia sul piano clinico che radiologico. Sebbene tali risultati siano in disaccordo con quelli ottenuti nel presente studio, nessun confronto diretto può essere compiuto a causa della differente metodologia delle ricerche.

I risultati ottenuti in questa ricerca mostrano una certa efficacia dell'acqua ozonizzata se considerata da sola; tuttavia, l'assenza di differenze significative al confronto col gruppo di controllo non permette di giungere a conclusioni definitive soprattutto a causa della presenza di alcune limitazioni nello studio come la non presa in considerazione del tipo di impianto e del tempo trascorso dal suo inserimento [Butera et al.,2021].

Il quarto studio è stato condotto per valutare l'efficacia di un gel ozonizzato rispetto ad un gel di clorexidina per il trattamento della mucosite perimplantare a seguito di un protocollo ambulatoriale e domiciliare di igiene orale con follow up di sei mesi. Considerando i valori dell'indice PPD, è stata rilevata una riduzione significativa e progressiva sia per il gruppo trattato con gel a base di clorexidina sia per quello trattato con gel ozonizzato, in assenza di differenze intergruppo significative. Un trend analogo è stato rilevato per gli indici SI e MMC. Per quanto concerne gli altri indici, è stata rilevata in entrambi i gruppi una riduzione intragruppo significativa e, inoltre, sono state rilevate differenze significative intergruppo. In particolare, i valori di PI sono risultati



significativamente inferiori a tre mesi (T<sub>2</sub>) nel gruppo trattato con gel ozonizzato. I valori di BoP, invece, sono risultati significativamente inferiori rispetto al gruppo di controllo durante tutte le rilevazioni condotte successivamente all'inizio dello studio. Infine, BS è risultato significativamente inferiore a tre e a sei mesi nel gruppo trattato con gel ozonizzato. Sulla base di questi risultati, il protocollo sperimentale basato sull'utilizzo ambulatoriale e domiciliare si è rivelato efficace per il trattamento della mucosite perimplantare, risultando maggiormente efficace rispetto al protocollo con clorexidina considerando specifici indici parodontali [Butera et al., 2022].

Analizzando gli studi pubblicati in letteratura, sembrerebbero disponibili ad oggi soltanto due studi sperimentali il cui scopo è stato quello di valutare l'efficacia di gel ozonizzati nel trattamento della mucosite perimplantare [Butera et al., 2021; McKenna et al., 2013], come riportato in una recente revisione della letteratura sui sistemi adiuvanti nel trattamento perimplantare non chirurgico [Butera et al., 2022b]. Un trial randomizzato controllato è stato condotto per confrontare l'effetto della somministrazione rispettivamente di acqua ozonizzata (trattamento sperimentale) e di acqua pura (trattamento di controllo) nei siti affetti da mucosite perimplantare [Butera et al., 2021]. In tale studio i pazienti affetti da mucosite sono stati assegnati in maniera randomizzata ad uno dei due protocolli di igiene professionale e rivalutati a distanza di 1 e 2 mesi. Sia nel gruppo sperimentale sia nel gruppo di controllo è stato utilizzato lo stesso irrigatore professionale per l'erogazione delle due sostanze testate, in assenza di differenze di colore o sapore tra queste ultime. Gli indici testati all'inizio dello studio e durante il follow up sono stati i seguenti: PPD, PI, BoP e BS. Relativamente alle differenze intragruppo, nel gruppo sperimentale è emerso che il trattamento con acqua ozonizzata ha significativamente e progressivamente comportato una riduzione di tutti gli indici testati,

ad eccezione di PI tra il primo e il secondo mese di follow up; al contrario, nessuna differenza significativa è risultata nel gruppo di controllo. Nessuna differenza significativa è risultata al confronto intergruppo tra i due trattamenti ai rispettivi tempi di valutazione.

Il secondo trial randomizzato controllato è stato condotto per valutare l'efficacia di applicazioni subgengivali di ozono e/o perossido di idrogeno in corrispondenza di siti affetti da mucosite perimplantare [McKenna et al., 2013]. I seguenti protocolli sperimentali sono stati applicati, sui siti affetti, in maniera randomizzata per 60 secondi e al giorno 0, 7 e 14: (1),  $O_2 + 0.9\% NaCl$  (gruppo di controllo), (2)  $O_2 + H_2O_2$  (3%), (3)  $O_3 + 0.9\% NaCl$ , e (4)  $O_3 + H_2O_2$  (3%). Al giorno 0, 7, 14, e 21 sono stati rilevati gli indici di placca, di infiammazione gengivale e di sanguinamento. Secondo gli Autori, entrambi i trattamenti basati sull'utilizzo dell'ozono hanno comportato un incremento negli indici di salute parodontale e, al tempo stesso, entrambi hanno controllato il sanguinamento in maniera più efficace rispetto agli altri trattamenti testati.

I risultati dello studio condotto nella presente ricerca mostrano che sia la clorexidina sia il gel ozonizzato risultano un valido supporto per il trattamento della mucosite perimplantare, con una maggior efficacia per quest'ultima sostanza considerando il miglioramento di specifici indici clinici (PI, BoP e BS). È comunque necessario tenere conto che alcune limitazioni dello studio, che rendono difficile generalizzare i risultati dello studio, sono rappresentati dall'eterogeneità degli impianti presenti nel cavo orale dei partecipanti dello studio e dalla differente durata di presenza in arcata degli impianti stessi [Butera et al., 2023]. Sulla base di questa considerazione, il trattamento domiciliare e professionale a base di ozono che è stato testato in questo studio sembra essere un valido supporto per il mantenimento degli impianti e per la salute dei tessuti perimplantari,

riportando un miglioramento in particolare degli indici PI, BoP e BS. Ulteriori studi dovrebbero essere condotti per valutare l'efficacia a lungo termine di tale trattamento e per confrontare tale protocollo con altri approcci non chirurgico, tra cui l'utilizzo del laser, delle polveri di glicina o eritritolo, e dei probiotici.

Dopo aver condotto la prima fase di questa ricerca valutando gli effetti dell'ozonoterapia sui tessuti parodontali e perimplantari affetti da infiammazione (rispettivamente perimplantite e mucosite perimplantare), è stato deciso di ampliare la valutazione dell'efficacia dell'utilizzo dell'ozonoterapia in odontoiatria focalizzando l'attenzione sulla possibilità di utilizzare le sostanze ozonizzate come agenti sbiancanti. Lo sbiancamento dentale rappresenta una procedura clinica comune sempre più richiesta dai pazienti per motivi estetici. Lo sbiancamento dentale può essere realizzato sia a livello ambulatoriale sia dai pazienti stessi a domicilio [Alkahtani et al., 2020]. La sostanza chimica più frequentemente utilizzata per lo sbiancamento dentale sono il perossido di idrogeno e il perossido di carbamide la cui azione sbiancante si esplica grazie ad un potere ossidante nei confronti dei pigmenti endogeni ed esogeni responsabili, rispettivamente, delle pigmentazioni dentali intrinseche (interne) ed estrinseche (esterne) [Suliman, 2005]. Lo sbiancamento professionale, anche chiamato sbiancamento "*in office*" è realizzato mediante l'utilizzo di una soluzione acquosa di perossido di idrogeno al 35% applicata per 20-30 minuti. Considerato l'alto potere ossidante di questa sostanza, risulta necessario prestare particolare attenzione ad evitare il contatto del perossido di idrogeno con i tessuti molli tramite l'isolamento con diga di gomma [Walsh, 2000]. Al contrario, il trattamento domiciliare, consiste nell'applicazione di un gel di perossido di carbamide ad una concentrazione del 10-20% attraverso l'utilizzo di mascherine trasparenti che

devono essere indossate dal paziente di notte [Llena et al., 2020].

Un aspetto rilevante legato allo sbiancamento dentale che deve essere tenuto in considerazione sono i rischi associati a questa procedura, in particolare la sensibilità dentale e l'irritazione gengivale. Entrambi questi effetti collaterali dipendono principalmente dalla concentrazione specifica del perossido utilizzato come sbiancante.

La ricerca sugli effetti dell'ozonoterapia in odontoiatria ha interessato anche lo studio dello sbiancamento dentale. L'efficacia dell'ozono utilizzato come agente sbiancante dipende dal tempo di applicazione e dall'effetto sinergico con altri agenti sbiancanti. Una recente revisione sistematica è stata condotta da Dietrich et al. [Dietrich et al., 2021] per determinare se il trattamento con ozono possa contribuire allo sbiancamento del dente vitale. Gli Autori hanno rilevato che l'efficacia sbiancante per la combinazione dell'ozono e del perossido di idrogeno è risultata simile a quella del perossido di idrogeno utilizzato da solo e, sulla base degli studi presenti in letteratura, hanno concluso che l'ozono è superiore alla tecnica convenzionale di sbiancamento con perossido di idrogeno. Inoltre, è stato anche evidenziata l'assenza di sensibilità a seguito dell'utilizzo esclusivo di ozono. Al contrario, in caso di combinazione delle due sostanze, i pazienti hanno mostrato una maggiore sensibilità in caso di applicazione dell'ozono prima del perossido di idrogeno, al contrario nessuna sensibilità è stata riportata scambiando l'ordine delle sostanze applicate.

Nonostante l'effetto sbiancante dell'ozono sia stato già valutato in letteratura, esiste ad oggi una scarsa evidenza circa il potenziale effetto sbiancante dell'ozono sulle resine composite. Tali materiali, sebbene estetici, presentano un alto tasso di pigmentazione estrinseca legato al consumo di sostanze come succhi di frutta, tè, caffè e bevande gassate. Sulla base di questa considerazione, è stato condotto un primo studio pilota con

l'obiettivo di valutare se i gel e gli oli ozonizzati possano costituire un valido ausilio nel determinare un cambiamento di colore delle resine dentali composite pigmentate con clorexidina, agente tipicamente noto per il suo effetto pigmentante [Gallo et al., 2023]. Dall'analisi dei dati è risultata un'influenza effettiva ma limitata da parte dell'ozono nei confronti del cambiamento di colore delle resine dentali, con una variazione limitata ai parametri colorimetrici E ed L. I campioni pigmentati con clorexidina, hanno riportato una variazione colorimetrica quando trattati con i prodotti ozonizzati rispetto ai campioni di controllo. Indipendentemente dalla formulazione di tali prodotti (olio o gel), entrambi i prodotti ozonizzati testati hanno mostrato il suddetto effetto benefico il quale, pertanto, può essere riferito direttamente al contenuto di ozono presente. Il meccanismo su cui si basa l'effetto sbiancante degli elementi dentali è rappresentato da una reazione ossidativa esercitata dall'agente sbiancante verso i pigmenti [Alkahtani et al., 2020]. Può essere quindi ipotizzato che un analogo meccanismo venga esercitato dall'ozono, sia sullo smalto sia sulle resine composite, visto il potenziale ossidante di questa sostanza [Walsh, 2000].

Merita inoltre di essere considerato che l'ozono potrebbe essere esercitare un effetto sbiancante senza comportare gli effetti collaterali tipicamente associati agli agenti sbiancanti convenzionali, in particolare la riduzione di microdurezza dello smalto. La riduzione di tale parametro a seguito dell'esposizione dello smalto è legata al processo di ossidazione delle componenti organiche ed inorganiche dello smalto esposto a sostanze sbiancanti, con conseguente formazione di porosità e micro-crack [Nematianaraki et al., 2015].

Seguendo la metodologia dello studio pilota precedentemente descritto, è stato condotto

un ulteriore studio con l'obiettivo di valutare l'efficacia dell'ozono nel comportare una variazione di colore delle resine dentali composite, questa volta a seguito di pigmentazione con tè. Seguendo sempre la metodica colorimetrica CIELAB, è stato deciso in questo caso di considerare come unico outcome il valore delta E ( $\Delta E$ ), in quanto riassuntivo degli altri indici considerati nel precedente studio. Nessuna variazione di colore significativa è emersa nei due gruppi nell'intervallo T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub>. Al contrario, nell'intervallo T<sub>1</sub>-T<sub>2</sub> una variazione di colore significativa con tendenza ad una colorazione più chiara è risultata evidente sia nei campioni pigmentati sia in quelli non pigmentati che sono stati sottoposti a trattamento con gel ozonizzato, al contrario nessuna variazione di colore significativa è risultata nei campioni trattati con solo olio di oliva. Sulla base di questa considerazione, anche questo studio conferma l'efficacia sbiancante dell'ozono in forma di gel nello sbiancamento di resine dentali composite.

Ad oggi i due studi qui descritti sembrerebbero essere gli unici lavori che hanno valutato la possibile applicazione dell'ozonoterapia nello sbiancamento delle resine composite dentali. I principali limiti di questi due studi sono legati al disegno *in vitro* e all'assenza di un trattamento di controllo positivo. Inoltre, l'effetto sbiancante dell'ozono è stato valutato esclusivamente su campioni pigmentati con clorexidina e con tè; tuttavia, altre sostanze pigmentanti di uso comune potrebbero mostrare una risposta differente a seguito dell'esposizione all'ozono. Ulteriori ricerche sono necessarie per comprendere appieno il possibile utilizzo dell'ozono nello sbiancamento dello smalto, delle resine composite e di altri materiali di comune utilizzo nella pratica odontoiatrica. Sarebbe inoltre interessante valutare se l'efficacia sbiancante dell'ozono possa variare a seconda della specifica tipologia di composito (ad esempio composito *flow*, *bulk*, etc.). Infine, sarebbe necessario condurre studi clinici che valutino anche *in vivo* il potere sbiancante

delle sostanze ozonizzate così come una prospettiva futura può essere rappresentata dalla valutazione dell'efficacia sbiancante di altre forme di ozonoterapia come l'erogazione ozono sotto forma di gas [Gallo et al., 2023].

Si precisa che le ricerche effettuate e discusse in questo elaborato sono stato oggetto delle seguenti pubblicazioni scientifiche su riviste indicizzate:

- Colombo M, Gallo S, Garofoli A, Poggio C, Arciola CR, Scribante A. Ozone Gel in Chronic Periodontal Disease: A Randomized Clinical Trial on the Anti-Inflammatory Effects of Ozone Application. *Biology* (Basel). 2021 Jul 6;10(7):625.
- Scribante, A.; Gallo, S.; Pascadopoli, M.; Soleo, R.; Di Fonso, F.; Politi, L.; Venugopal, A.; Marya, A.; Butera, A. Management of Periodontal Disease with Adjunctive Therapy with Ozone and Photobiomodulation (PBM): A Randomized Clinical Trial. *Photonics* 2022, 9, 138.
- Butera, A.; Gallo, S.; Pascadopoli, M.; Luraghi, G.; Scribante, A. Ozonized Water Administration in Peri-Implant Mucositis Sites: A Randomized Clinical Trial. *Appl. Sci.* 2021, 11, 7812.
- Butera A, Pascadopoli M, Gallo S, Pérez-Albacete Martínez C, Maté Sánchez de Val JE, Parisi L, Gariboldi A, Scribante A. Ozonized Hydrogels vs. 1% Chlorhexidine Gel for the Clinical and Domiciliary Management of Peri-Implant Mucositis: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Med.* 2023 Feb 12;12(4):1464.
- Gallo, S.; Colombo, M.; Poggio, C.; Scribante, A.; Saracino, M.; Beltrami, R. Bleaching Effect of Ozonized Substances on Resin Composite: A New Potentiality for Ozone Therapy in Dentistry. *Appl. Sci.* 2023, 13, 2149.



## **6. CONCLUSIONI**

La valutazione di nuovi trattamenti topici in grado di mostrare effetti antimicrobici ed altri vantaggi in assenza di effetti citotossici verso l'organismo umano si sta sempre più affermando nella ricerca biomedica.

I filoni sperimentali condotti in questo studio hanno mostrato un effetto positivo da parte dell'ozono somministrato in forma di gel, gas e acqua nel miglioramento della patologia parodontale e della mucosite perimplantare. Tale effetto si evince dal miglioramento degli indici di infiammazione parodontale normalmente utilizzati nella pratica clinica e ai fini epidemiologici. Sebbene la variazione di tali indici sia risultata talvolta non statisticamente differente rispetto al trattamento di controllo con clorexidina, è necessario considerare che l'utilizzo di quest'ultima sostanza è generalmente associata ad effetti collaterali specie se utilizzata per lunghi periodi, tra cui la disgeusia e la pigmentazione delle superfici dentali. Sulla base di tale considerazione è possibile ritenere che l'ozono possa essere una valida alternativa rispetto alla clorexidina nel trattamento chimico delle patologie infiammatorie parodontali, in supporto alla terapia meccanica.

In aggiunta a ciò, l'utilizzo di ozono sotto forma di gel ozonizzato si è rivelato efficace nel comportare una variazione colorimetrica delle resine composite di comune utilizzo in odontoiatria restaurativa. Sebbene esistano evidenze precedenti circa l'efficacia dell'ozono come agente sbiancante, non risultano ad oggi pubblicati lavori che abbiano testato questa capacità sbiancante anche sui materiali restaurativi.

Ulteriori studi basati su differenti metodologie di ricerca sono necessari per testare ulteriormente l'efficacia dell'ozono e per confermare la validità esterna dei risultati qui ottenuti, oltre che per confrontare l'effetto dell'ozono con altri sistemi adiuvanti di utilizzo in odontoiatria così come per valutare un potenziale effetto sinergico.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 22;3:17038.
2. Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes. *Br Dent J*. 2019 Oct;227(7):577-584.
3. Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. Princeton, New Jersey, July 23–27, 1989. In: Nevins M, Becker W, Kornman K, eds. Chicago: American Academy of Periodontology; 1989.
4. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25:134– 144.
5. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*. 1996;1:1– 36.
6. Michalowicz BS, Aeppli DP, Kuba RK, et al. A twin study of genetic variation in proportional radiographic alveolar bone height. *J Dent Res*. 1991;70:1431–1435.
7. Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71:1699–1707.
8. Lang NP, Bartold PM, Cullinan M, et al. Consensus report: aggressive periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4:53.
9. Lindhe J, Ranney R, Lamster I, et al. Consensus report: chronic periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999;4:38.
10. American Academy of Periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions. *J Periodontol*. 2015;86:835– 838

11. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172.
12. Barbosa VL, Angst PD, Finger Stadler A, Oppermann RV, Gomes SC. Clinical attachment loss: estimation by direct and indirect methods. *Int Dent J*. 2016 Jun;66(3):144-9.
13. Tugnait A, Carmichael F. Use of radiographs in the diagnosis of periodontal disease. *Dent Update*. 2005 Nov;32(9):536-8, 541-2.
14. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83:1449-1454.
15. Tonetti MS. Claffey N, European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology.
16. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8.
17. Okubo M, Kuraji R, Kamimura H, Numabe Y, Ito K, Sato T, Kokabu S. A Case of Necrotizing Periodontitis in a Care-Requiring Elderly Person Treated and

Managed by Interprofessional Collaboration. Dent J (Basel). 2022 May 7;10(5):79.

18. Arigbede AO, Babatope BO, Bamidele MK. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. J Indian Soc Periodontol. 2012 Oct;16(4):487-91.
19. Cortellini P, Stalpers G, Mollo A, Tonetti MS. Periodontal regeneration versus extraction and prosthetic replacement of teeth severely compromised by attachment loss to the apex: 5-year results of an ongoing randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2011;38:915– 924.
20. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Haffajee AD. Long term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. J Clin Periodontol. 1984;11:448–458.
21. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999;4:1–6.
22. Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. J Clin Periodontol. 2008;35:277–290.
23. McGuire MK, Nunn ME. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. J Periodontol. 1999;70:49–56.
24. Sanz M, Kornman K, working group 3 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint

- EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol.* 2013;84(4 Suppl.):S164–169.
25. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: a call for global action. *J Clin Periodontol.* 2017;44:456– 462. 67.
26. Giannobile WV, Braun TM, Caplis AK, Doucette-Stamm L, Duff GW, Kornman KS. Patient stratification for preventive care in dentistry. *J Dent Res.* 2013;92:694–701.
27. Lang NP, Suvan JE, Tonetti MS. Risk factor assessment tools for the prevention of periodontitis progression a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2015;42(Suppl 16):S59–70.
28. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, Chen S, Cochran D, Derks J, Figuero E, Hämmerle CHF, Heitz-Mayfield LJA, Huynh-Ba G, Iacono V, Koo KT, Lambert F, McCauley L, Quirynen M, Renvert S, Salvi GE, Schwarz F, Tarnow D, Tomasi C, Wang HL, Zitzmann N. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S286-S291.
29. Sabancı A, Karasu B, Sabancı HI, Kuku İ, Kırmızıgül OA. Impact of periodontal status on the oral mucositis in patients receiving high-dose chemotherapy. *Clin Oral Investig.* 2022 Oct;26(10):6341-6346.

30. Khammissa RA, Feller L, Meyerov R, Lemmer J. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: clinical and histopathological characteristics and treatment. *SADJ*. 2012 Apr;67(3):122, 124-6.
31. Bocci V, Di Paolo N. Oxygen-ozone therapy in medicine: an update. *Blood Purif*. (2009) 28:373–6. 10.1159/000236365
32. Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS, Fahmy Z. Ozone in medicine: the low-dose ozone concept-guidelines and treatment strategies. *Ozone Sci Eng*. (2012) 34:408–24.
33. Bocci, V. How ozone acts and how it exerts therapeutic effects. in *Ozone: the revolution in dentistry*. (ed. Lynch, E.) 15–22 (Quintessence Publishing Co, 2004).
34. Schwartz, A. & Sánchez, G. Ozone Therapy and Its Scientific Foundations. *Rev. Española Ozonoterapia* (2012).
35. Stübinger, S., Sader, R. & Filippi, A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence Int*. (2006).
36. Bocci, V. Ozone: A new medical drug. *Ozone: A New Medical Drug* (2005). doi:10.1007/1-4020-3140-8.
37. Celiberti, P., Pazera, P. & Lussi, A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am. J. Dent*. (2006).
38. Nagayoshi, M. et al. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol*. (2004)



39. Holmes, J. Clinical reversal of root caries using ozone, doubleblind, randomised, controlled 18-month trial. *Gerodontology* (2003)
40. Grootveld M, Baysan A, Sidiiqui N, Sim J, Silwood C, L. E. History of the clinical applications of ozone. in *Ozone: The Revolution in Dentistry* (ed. Lynch E, editor.) 23–30 (Quintessence Publishing Co, 2004)
41. Bocci, V. Ozone as Janus: This controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators of Inflammation* (2004)
42. Schwartz, A. & Sánchez, G. Ozone Therapy and Its Scientific Foundations. *Rev. Española Ozonoterapia* (2012).
43. Baysan A, L. E. Antimicrobial effects of ozone on caries. In *Ozone: the revolution in dentistry*. (ed. Lynch E, editor) 165–72. (Quintessence Publishing Co., 2004).79
44. Elvis, A. M. & Ekta, J. S. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* (2011) doi:10.4103/0976-9668.82319.
45. Azarpazhooh, A. & Limeback, H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry* (2008)
46. Ajamieh, H.H.; Berlanga, J.; Merino, N.; Sánchez, G.M.; Carmona, A.M.; Cepero, S.M.; Giuliani, A.; Re, L.; León, O.S. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transpl. Int.* 2005, 18, 604–612
47. Bocci, V.A. Why orthodox medicine has not yet taken advantage of ozone therapy. *Arch. Med. Res.* 2008, 39, 259–260.

48. Mawsouf, M.N.; Tanbouli, T.T.; Viebahn-Hänsler, R. Ozone Therapy in Patients with Viral Hepatitis C: Ten Years' Experience. *Ozone Sci. Eng.* 2012, 34, 451–458.
49. Shah, M.A.; Anande, L.K.; Powar, A.; Captain, J.; Mk Nair, P. The Role of Medical Ozone in Improving Antioxidant Status in Multiple Drug-Resistant Tuberculosis Patients: A Quasi-experimental Study. *Middle East J. Rehabil. Health Stud.* 2019, 6, e97125.
50. Dobkin, V.G.; Sadovnikova, S.S.; Kuz'min, G.P.; Bondarev, G.B. [Local ozone therapy in the complex surgical treatment of pulmonary and pleural tuberculosis patients]. *Probl. Tuberk.* 2001, 7, 18–20.
51. Galluccio, F. Rapid and Sustained Effect of Ozone Major Autohemotherapy for Raynaud and Hand Edema in Systemic Sclerosis Patient: A Case Report. *Cureus* 2022, 14, e31831
52. Hidalgo-Tallón, J.; Menéndez-Cepero, S.; Vilchez, J.S.; Rodríguez-López, C.M.; Calandre, E.P. Ozone therapy as add-on treatment in fibromyalgia management by rectal insufflation: An open-label pilot study. *J. Altern. Complement. Med.* 2013, 19, 238–242
53. Hidalgo-Tallón, J.; Menéndez-Cepero, S.; Vilchez, J.S.; Rodríguez-López, C.M.; Calandre, E.P. Ozone therapy as add-on treatment in fibromyalgia management by rectal insufflation: An open-label pilot study. *J. Altern. Complement. Med.* 2013, 19, 238–24
54. Takahashi, H.; Fujimoto, C.; Matsui, H.; Igarashi, T.; Shiwa, T.; Ohara, K.; Sugita, T. Anterior chamber irrigation with an ozonated solution as prophylaxis

- against infectious endophthalmitis. *J. Cataract. Refract. Surg.* 2004, 30, 1773–1780.
55. Bocci, V. The Actual Six Therapeutic Modalities. In *OZONE: A New Medical Drug*; Bocci, V., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2011; pp. 35–74
56. Bocci, V. Physical-Chemical Properties of Ozone—Natural Production of Ozone: The Toxicology of Ozone. In *OZONE: A New Medical Drug*; Bocci, V., Ed.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2011; pp. 1–4
57. Lipatov, K.V.; Sopromadze, M.A.; Shekhter, A.B.; Rudenko, T.G.; Emel'ianov, A. [Ozone-ultrasonic therapy in the treatment of purulent wounds]. *Khirurgiia* 2002, 1, 36–39.
58. Rickard, G.D.; Richardson, R.; Johnson, T.; McColl, D.; Hooper, L. Ozone therapy for the treatment of dental caries. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2004, 3, CD004153.
59. Dukic, W.; Juric, H.; Andrasevic, A.T.; Kovacevic, V.; Dukic, O.L.; Delija, B. The efficacy of gaseous ozone on some cariogenic bacteria. *Coll. Antropol.* 2013, 37, 109–113.
60. El Meligy, O.A.; Elemam, N.M.; Talaat, I.M. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry: A Review of the Literature. *Dent. J.* 2023, 11, 187.
61. Nogales, C.G.; Ferrari, P.H.; Kantorovich, E.O.; Lage-Marques, J.L. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2008, 9, 75–84.

62. Re, K.; Gandhi, J.; Liang, R.; Patel, S.; Joshi, G.; Smith, N.L.; Reid, I.; Khan, S.A. Clinical utility of ozone therapy and hyperbaric oxygen therapy in degenerative disc disease. *Med. Gas Res.* 2023, 13, 1–6.
63. Baysan, A.; Lynch, E. The use of ozone in dentistry and medicine. *Prim. Dent. Care* 2005, 12, 47–52
64. Serafini, G.; De Biase, A.; Lamazza, L.; Mazzucchi, G.; Lollobrigida, M. Efficacy of Topical Treatments for the Management of Symptomatic Oral Lichen Planus: A Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2023, 20, 1202.
65. . Colombo, M.; Gallo, S.; Garofoli, A.; Poggio, C.; Arciola, C.R.; Scribante, A. Ozone Gel in Chronic Periodontal Disease: A Randomized Clinical Trial on the Anti-Inflammatory Effects of Ozone Application. *Biology* 2021, 10, 625.
66. Isler, S.C.; Uraz, A.; Guler, B.; Ozdemir, Y.; Cula, S.; Cetiner, D. Effects of Laser Photobiomodulation and Ozone Therapy on Palatal Epithelial Wound Healing and Patient Morbidity. *Photomed. Laser Surg.* 2018, 36, 571–580
67. Re, L.; Sanchez, G.M.; Mawsouf, N. Clinical evidence of ozone interaction with pain mediators. *Saudi Med. J.* 2010, 31, 1363–1367.
68. Santos, G.M.; Pacheco, R.L.; Bussadori, S.K.; Santos, E.M.; Riera, R.; de Oliveira Cruz Latorraca, C.; Mota, P.; Benavent Caldas Bellotto, E.F.; Martimbianco, A.L.C. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. *J. Evid. Based Dent. Pract.* 2020, 20, 101472.

69. Nicolini, A.C.; Rotta, I.D.S.; Langa, G.P.J.; Friedrich, S.A.; Arroyo-Bonilla, D.A.; Wagner, M.C.; Weidlich, P.; Rösing, C.K.; Cavagni, J. Efficacy of ozonated water mouthwash on early plaque formation and gingival inflammation: A randomized controlled crossover clinical trial. *Clin. Oral Investig.* 2021, 25, 1337–1344.
70. Froum SJ, Shi Y, Reis N, Asvaplungprohm T. A Narrative Review of the Diagnosis, Etiology, and Treatment of Halitosis Over the Past Three Decades. *Compend Contin Educ Dent.* 2022 May;43(5):E5-eE8.
71. Lena, K.; Marianne, K. Ozone Treatment on Dentin Hypersensitivity Surfaces—A Pilot Study. *Open Dent. J.* 2017, 11, 65–70.
72. Huth, K.C.; Quirling, M.; Lenzke, S.; Paschos, E.; Kamereck, K.; Brand, K.; Hickel, R.; Ilie, N. Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur. J. Oral Sci.* 2011, 119, 204–210.
73. Yilmaz, S.; Algan, S.; Gursoy, H.; Noyan, U.; Kuru, B.E.; Kadir, T. Evaluation of the clinical and antimicrobial effects of the Er:YAG laser or topical gaseous ozone as adjuncts to initial periodontal therapy. *Photomed. Laser Surg.* 2013, 31, 293–298
74. Dodwad V, Gupta S, Kumar K, Sethi M, Masamatti S. Changing paradigm in pocket therapy-ozone versus conventional irrigation. *Int J Public Health Dent.* 2011;2:7–12.
75. Huth, K. C. et al. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int. Endod. J.* (2009)

76. Estrela, C., Estrela, C. R. A., Decurcio, D. A., Hollanda, A. C. B. & Silva, J. A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int. Endod. J.* (2007)
77. Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T. & Terashita, M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria 78 invading dentinal tubules. *J. Endod.* (2004)
78. Baysan, A., Whiley, R. A. & Lynch, E. Antimicrobial Effect of a Novel Ozone-Generating Device on Micro-Organisms Associated with Primary Root Carious Lesions in vitro. *Caries Res.* (2000)
79. Sánchez, A. R., Rogers, R. S. & Sheridan, P. J. Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity. *International Journal of Dermatology* (2004) doi:10.1111/j.1365- 4632.2004.02108.x
80. Hammuda et al. Use of ozone in temporomandibular joint arthrocentesis, clinical study. *J Am Sci* 9, (2013).
81. Tessier, J., Rodriguez, P. N., Lifshitz, F., Friedman, S. M. & Lanata, E. J. The use of ozone to lighten teeth. An experimental study. *Acta Odontol. Latinoam.* (2010).
82. Petrucci, M. T., Gallucci, C., Agrillo, A., Mustazza, M. C. & Foà, R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica* (2007)
83. Ripamonti, C. I., Maniezzo, M., Pessi, M. A. & Boldini, S. Treatment of osteonecrosis of the jaw (ONJ) by medical ozone gas insufflation. A case report. *Tumori* (2012)

84. Daif, E. T. Role of intra-articular ozone gas injection in the management of internal derangement of the temporomandibular joint. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* (2012)
85. Doğan, M. et al. Effects of high-frequency bio-oxidative ozone therapy in temporomandibular disorder-related pain. *Med. Princ. Pract.* (2014).
86. Akram, Z.; Shafqat, S.S.; Aati, S.; Kujan, O.; Fawzy, A. Clinical efficacy of probiotics in the treatment of gingivitis: A systematic review and meta-analysis. *Aust. Dent. J.* 2020, 65, 12–20.
87. Scribante, A.; Gallo, S.; Pascadopoli, M.; Soleo, R.; Di Fonso, F.; Politi, L.; Venugopal, A.; Marya, A.; Butera, A. Management of Periodontal Disease with Adjunctive Therapy with Ozone and Photobiomodulation (PBM): A Randomized Clinical Trial. *Photonics* 2022, 9, 138
88. Yılmaz, S.; Algan, S.; Gursoy, H.; Noyan, U.; Kuru, B.E.; Kadir, T. Evaluation of the clinical and antimicrobial effects of the Er:YAG laser or topical gaseous ozone as adjuncts to initial periodontal therapy. *Photomed. Laser Surg.* 2013, 31, 293–298.
89. Butera, A.; Gallo, S.; Pascadopoli, M.; Luraghi, G.; Scribante, A. Ozonized Water Administration in Peri-Implant Mucositis Sites: A Randomized Clinical Trial. *Appl. Sci.* 2021, 11, 7812.
90. Ji, Y.J.; Tang, Z.H.; Wang, R.; Cao, J.; Cao, C.F.; Jin, L.J. Effect of glycine powder air-polishing as an adjunct in the treatment of peri-implant mucositis: A pilot clinical trial. *Clin. Oral Implants Res.* 2014, 25, 683–689.

91. Butera, A.; Pascadopoli, M.; Gallo, S.; Pérez-Albacete Martínez, C.; Maté Sánchez de Val, J.E.; Parisi, L.; Gariboldi, A.; Scribante, A. Ozonized Hydrogels vs. 1% Chlorhexidine Gel for the Clinical and Domiciliary Management of Peri-Implant Mucositis: A Randomized Clinical Trial. *J. Clin. Med.* 2023, 12, 1464.
92. Isler, S.C.; Unsal, B.; Soysal, F.; Ozcan, G.; Peker, E.; Karaca, I.R. The effects of ozone therapy as an adjunct to the surgical treatment of peri-implantitis. *J. Periodontal. Implant Sci.* 2018, 48, 136–151.
93. Hafez, R.; Ahmed, D.; Yousry, M.; El-Badrawy, W.; El-Mowafy, O. Effect of in-office bleaching on color and surface roughness of composite restoratives. *Eur. J. Dent.* 2010, 4, 118–127.
94. Gallo, S.; Colombo, M.; Poggio, C.; Scribante, A.; Saracino, M.; Beltrami, R. Bleaching Effect of Ozonized Substances on Resin Composite: A New Potentiality for Ozone Therapy in Dentistry. *Appl. Sci.* 2023, 13, 2149.
95. Gómez-Polo, C.; Portillo Muñoz, M.; Lorenzo Luengo, M.C.; Vicente, P.; Galindo, P.; Martín Casado, A.M. Comparison of the CIELab and CIEDE2000 color difference formulas. *J. Prosthet. Dent.* 2016, 115, 65–70.
96. Gallo S and Scribante A. 2021 *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 707 012001
97. Scassellati C, Galoforo AC, Bonvicini C, Esposito C, Ricevuti G. Ozone: a natural bioactive molecule with antioxidant property as potential new strategy in aging and in neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev.* 2020 Nov;63:101138.
98. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009 Jul;29(4):646-82.



99. Kaur, A.; Bhavikatti, S.K.; Das, S.S.; Khanna, S.; Jain, M.; Kaur, A. Efficacy of Ozonised Water and 0.2% Chlorhexidine Gluconate in the Management of Chronic Periodontitis when Used as an Irrigant in Conjugation with Phase I Therapy. *J. Contemp. Dent. Pract.* 2019, 20, 318–323.
100. Gandhi KK, Cappetta EG, Pavaskar R. Effectiveness of the adjunctive use of ozone and chlorhexidine in patients with chronic periodontitis. *BDJ Open*. 2019 Nov 28;5:17.
101. Kshitish, D.; Laxman, V.K. The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: A clinical and microbiologic study. *Indian J. Dent. Res.* 2010, 21, 341–348.
102. Moraschini, V.; Kischinhevsky, I.C.C.; Calasans-Maia, M.D.; Shibli, J.A.; Sartoretto, S.C.; Figueredo, C.M.; Granjeiro, J.M. Ineffectiveness of ozone therapy in nonsurgical periodontal treatment: A systematic review and metaanalysis of randomized clinical trials. *Clin. Oral Investig.* 2020, 24, 1877–1888.
103. Huth, K.C.; Jakob, F.M.; Saugel, B.; Cappello, C.; Paschos, E.; Hollweck, R.; Hickel, R.; Brand, K. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur. J. Oral Sci.* 2006, 114, 435–440.
104. Meimandi, M.; Talebi Ardakani, M.R.; Esmaeil Nejad, A.; Yousefnejad, P.; Saebi, K.; Tayeed, M.H. The Effect of Photodynamic Therapy in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Review of Literature. *J. Lasers Med. Sci.* 2017, 8, S7–S11.

105. Merigo, E.; Rocca, J.P.; Pinheiro, A.L.B.; Fornaini, C. Photobiomodulation Therapy in Oral Medicine: A Guide for the Practitioner with Focus on New Possible Protocols. *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.* 2019, 37, 669–680.
106. Caruso, U.; Natri, L.; Piccolomini, R.; d'Ercole, S.; Mazza, C.; Guida, L. Use of diode laser 980 nm as adjunctive therapy in the treatment of chronic periodontitis. A randomized controlled clinical trial. *New Microbiol.* 2008, 31, 513–518.
107. Özberk, S.S.; Gündoğar, H.; Özkaya, M.; Taner, İ.L.; Erciyas, K. The effect of photobiomodulation therapy on nonsurgical periodontal treatment in patients with type 2 diabetes mellitus: A randomized controlled, single-blind, split-mouth clinical trial. *Lasers Med. Sci.* 2020, 35, 497–504.
108. Yılmaz, S.; Algan, S.; Gursoy, H.; Noyan, U.; Kuru, B.E.; Kadir, T. Evaluation of the clinical and antimicrobial effects of the Er:YAG laser or topical gaseous ozone as adjuncts to initial periodontal therapy. *Photomed. Laser Surg.* 2013, 31, 293–298.
109. Ren, C.; McGrath, C.; Jin, L.; Zhang, C.; Yang, Y. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: A meta-analysis. *J. Periodontal. Res.* 2017, 52, 8–20.
110. Dalvi, S.; Benedicenti, S.; Hanna, R. Effectiveness of Photobiomodulation as an Adjunct to Nonsurgical Periodontal Therapy in the Management of Periodontitis- A Systematic Review of in vivo Human Studies. *Photochem. Photobiol.* 2021, 97, 223–242.

111. McKenna, D.F.; Borzabadi-Farahani, A.; Lynch, E. The effect of subgingival ozone and/or hydrogen peroxide on the development of peri-implant mucositis: A double-blind randomized controlled trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2013, 28, 1483–1489.
112. Isler, S.C.; Unsal, B.; Soysal, F.; Ozcan, G.; Peker, E.; Karaca, I.R. The effects of ozone therapy as an adjunct to the surgical treatment of peri-implantitis. *J. Periodontal Implant Sci.* 2018, 48, 136–151.
113. Butera, A.; Pascadopoli, M.; Pellegrini, M.; Gallo, S.; Zampetti, P.; Cuggia, G.; Scribante, A. Domiciliary Use of Chlorhexidine vs. Postbiotic Gels in Patients with Peri-Implant Mucositis: A Split-Mouth Randomized Clinical Trial. *Appl. Sci.* 2022, 12, 2800.
114. McKenna, D.F.; Borzabadi-Farahani, A.; Lynch, E. The effect of subgingival ozone and/or hydrogen peroxide on the development of peri-implant mucositis: A double-blind randomized controlled trial. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2013, 28, 1483–1489.
115. Alkahtani R, Stone S, German M, Waterhouse P. A review on dental whitening. *J Dent.* 2020 Sep;100:103423.
116. Sulieman M. An overview of tooth discoloration: extrinsic, intrinsic and internalized stains. *Dent Update.* 2005 Oct;32(8):463-4, 466-8, 471.
117. Walsh LJ. Safety issues relating to the use of hydrogen peroxide in dentistry. *Aust Dent J.* 2000 Dec;45(4):257-69; quiz 289.

118. Llena C, Villanueva A, Mejias E, Forner L. Bleaching efficacy of at home 16% carbamide peroxide. A long-term clinical follow-up study. J Esthet Restor Dent. 2020 Jan;32(1):12-18.
119. Dietrich, L.; de Assis Costa, M.D.M.; Blumenberg, C.; Nascimento, G.G.; Paranhos, L.R.; da Silva, G.R. A meta-analysis of ozone effect on tooth bleaching. Sci. Rep. 2021, 11, 13177.
120. Nematianaraki S, Fekrazad R, Naghibi N, Kalhori KA, Junior AB. Effects of the bleaching procedures on enamel micro-hardness: Plasma Arc and diode laser comparison. Laser Ther. 2015 Oct 2;24(3):173-7.

## RINGRAZIAMENTI

*Al termine di questo percorso desidero ringraziare chi ha contribuito alla sua realizzazione. Ringrazio il Prof. Gianluigi Marseglia, Direttore del Dipartimento di Scienze Clinico Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche cui afferisce la Sezione di Odontoiatria dell'Università di Pavia. Ringrazio la Prof.ssa Paola Gandini, la Prof.ssa Maria Francesca Sfondrini e la Prof.ssa Marina Vitale dell'U.D.A. di Ortognatodonzia e Odontoiatria Infantile presso la quale ho svolto questo percorso di ricerca.*

*Desidero poi ringraziare in particolare il Prof. Andrea Scribante, Relatore di questa Tesi, e il Prof. Claudio Poggio per le opportunità concesse, la disponibilità, il sostegno e per tutto il lavoro svolto in questi anni a partire dal periodo finale del Corso di Laurea in Odontoiatria e Protesi Dentaria. È stato un grande piacere!*

*Ringrazio inoltre il Prof. Andrea Butera e Maurizio per la collaborazione nell'attività di ricerca svolta e per aver reso il tutto ancora più divertente.*

*Ci tengo infine a ringraziare ogni Studente con cui ho avuto l'occasione di interfacciarmi in quest'ultimo anno per attività didattiche o di ricerca, spero di aver apportato, nel mio piccolo, un contributo positivo e utile nei rispettivi percorsi di studio.*