

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F1

Settore Scientifico disciplinare: MED/28

EFFETTI DEL LASER A BASSA DOSE SU CELLULE OSTEOBLASTICHE

Presentata da: Dr.ssa Serena Incerti Parenti

Coordinatore Dottorato

Prof. Lucio Cocco

Relatore

Prof. Luigi Checchi

Esame finale anno 2016

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 <i>Bibliografia</i>	5
2. PARTE SPERIMENTALE I	
2.1 <i>Materiale e metodi</i>	8
2.2 <i>Risultati</i>	12
2.3 <i>Discussione e conclusioni</i>	18
2.4 <i>Bibliografia</i>	23
3. PARTE SPERIMENTALE II	
3.1 <i>Materiale e metodi</i>	27
3.2 <i>Risultati</i>	32
3.3 <i>Discussione e conclusioni</i>	41
3.4 <i>Bibliografia</i>	46

Introduzione

La terapia laser a bassa dose (Low Level Laser Therapy o LLLT) è una metodica clinica di importante utilizzo in ambito medico per la riduzione dei processi infiammatori, di quelli dolorosi e per la accelerazione dei processi di guarigione tissutale.¹⁻³ La LLLT, anche conosciuta come “soft laser therapy” o “fotobiomodulazione”, si avvale di laser con lunghezza d’onda compresa tra 600 e 1100 nm e di dosi basse, comprese tra 0.04 e 50 J/cm².⁴ L’effetto di tale terapia non è termico, bensì correlato al verificarsi di reazioni fotobiologiche e fotochimiche all'interno delle cellule in grado di generare una serie di modifiche nel metabolismo tissutale grazie alla sola azione della luce laser.⁴ Tutto ciò è in totale contrapposizione all’incremento termico indotto a livello cellulare dalla cosiddetta “terapia laser ad alta intensità”, che sta invece alla base della capacità ablativa tissutale.

La LLLT è stata descritta in letteratura a partire dai primi anni '70, allorquando Mester⁵ dimostrò gli effetti benefici sulla guarigione delle ferite cutanee su ratti. Essa ha trovato successivamente un ampio utilizzo nella prevenzione e nella terapia delle mucositi indotte da chemioterapia e radioterapia nei pazienti affetti da tumori della regione testa-collo.⁶⁻⁸

Le applicazioni cliniche meglio documentate per la LLLT sono quelle impiegate nel sistema muscolo-scheletrico per il trattamento del dolore, delle osteoartriti e delle tendiniti.⁹⁻¹¹ In ambito odontoiatrico alcune ricerche sperimentali hanno evidenziato gli effetti positivi nella guarigione dell’osso alveolare dopo estrazioni dentarie e sulla rigenerazione dell’osso nella sutura palatina mediana dopo espansione del mascellare.^{12,13} Al di là del ruolo antalgico della LLLT in ortodonzia,¹⁴ non sono invece ancora

chiariti i suoi effetti sulla velocità dello spostamento ortodontico dei denti.¹⁵⁻¹⁷

La modulazione dei processi biologici alla base del rimodellamento osseo da parte della LLLT rappresenta una strategia molto promettente in quanto semplice, non invasiva, non dolorosa e senza apparenti effetti avversi, a beneficio della qualità di vita dei pazienti. Permangono tuttavia ancora numerose incertezze sulle modalità e sui parametri ottimali di applicazione terapeutica. Diverse dosi, lunghezze d'onda, tempi di esposizione, frequenze e potenze di irradiazione laser sono state infatti diversamente proposte in letteratura. Ciò rende quasi impossibile estrapolare linee guida univoche ed è quindi necessario esaminare i parametri di irradiazione laser in maniera rigorosa a livello cellulare prima di una loro incorporazione su larga scala nella pratica clinica.

L'obbiettivo è stato quindi quello di determinare la dose ottimale di irradiazione laser sugli osteoblasti, cellule chiave nel processo di rimodellamento osseo. A tal fine sono stati valutati *in vitro* gli effetti biostimolanti o bioinibitori di diverse dosi di laser su vitalità cellulare, contenuto di DNA e rilascio di alcune proteine importanti per il rimodellamento osseo e la neoangiogenesi (parte sperimentale I).

Le dosi di irradiazione laser risultate più biostimolanti sono state poi utilizzate nella parte sperimentale II, volta a indagare la capacità del laser di stimolare la riparazione di microferite *in vitro* su cellule osteoblastiche. Nello specifico, sono stati valutati gli effetti del laser su migrazione e proliferazione di osteoblasti sottoposti ad un protocollo di microferita *in vitro*, su espressione genica e rilascio di alcune proteine legate al metabolismo osseo.

Bibliografia

1. Marini I, Gatto MR, Bonetti GA. Effects of superpulsed low-level laser therapy on temporomandibular joint pain. *Clin J Pain* 2010;26:611-6.
2. Scoletta M, Arduino PG, Reggio L, Dalmaso P, Mozzati M. Effect of low-level laser irradiation on bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws: preliminary results of a prospective study. *Photomed Laser Surg* 2010;28:179-84.
3. Huang Z, Ma J, Chen J, Shen B, Pei F, Kraus VB. The effectiveness of low-level laser therapy for nonspecific chronic low back pain: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:360.
4. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2012;27:237-49.
5. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 1971;122:532-5.
6. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tunè J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RA. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 2011;19:1069–77.
7. Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG, Vadhira BM. Low level laser therapy for concurrent chemoradiotherapy induced oral mucositis in head and neck cancer patients – a triple blinded randomized controlled trial. *Radiother Oncol* 2012;104:349–54.
8. Bensadoun RJ, Nair RG. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. *Curr Opin Oncol* 2012;24:363–70.
9. Chow RT, Johnson MI, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic

- review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet* 2009;374:1897–908.
10. Nakamura T, Ebihara S, Ohkuni I, Izukura H, Harada T, Ushigome N, Ohshiro T, Musha Y, Takahashi H, Tsuchiya K, Kubota A. Low Level Laser Therapy for chronic knee joint pain patients. *Laser Ther* 2014;23:273-7.
 11. Haslerud S, Magnussen LH, Joensen J, Lopes-Martins RA, Bjordal JM. The efficacy of low-level laser therapy for shoulder tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Physiother Res Int* 2015;20:108-25.
 12. Mozzati M, Martinasso G, Cocero N, Pol R, Maggiora M, Muzio G, Canuto RA. Influence of superpulsed laser therapy on healing processes following tooth extraction. *Photomed Laser Surg* 2011;29:565-71.
 13. Angeletti P, Pereira MD, Gomes HC, Hino CT, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:e38-46.
 14. Marini I, Bartolucci ML, Bortolotti F, Innocenti G, Gatto MR, Alessandri Bonetti G. The effect of diode superpulsed low-level laser therapy on experimental orthodontic pain caused by elastomeric separators: a randomized controlled clinical trial. *Lasers Med Sci* 2015;30:35-41.
 15. Long H, Zhou Y, Xue J, Liao L, Ye N, Jian F, Wang Y, Lai W. The effectiveness of low-level laser therapy in accelerating orthodontic tooth movement: a meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2015;30:1161-70.
 16. Carvalho-Lobato P, Garcia VJ, Kasem K, Ustrell-Torrent JM, Tallón-Walton V, Manzanares-Céspedes MC. Tooth movement in orthodontic treatment with low-level laser therapy: a systematic review of human and animal studies. *Photomed Laser Surg* 2014;32:302-9.

17. Ge MK, He WL, Chen J, Wen C, Yin X, Hu ZA, Liu ZP, Zou SJ. Efficacy of low-level laser therapy for accelerating tooth movement during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Lasers Med Sci* 2015;30:1609-18.

MATERIALE E METODI

Colture cellulari

Cellule umane simil-osteoblastiche Saos-2 (ATCC® HTB-85™, Manassas) sono state coltivate in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) con siero bovino fetale al 10% (Lonza Walkersville Inc., Walkersville), 100 IU/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina in soluzione (Gibco Invitrogen SRL, San Giuliano Milanese, MI, Italy) a 37°C in atmosfera a umidità controllata (95% air/5% CO₂). Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura mediante trattamento con una miscela di tripsina 0.05% (w/v) e di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0.02% (w/v) e contate. Una sospensione cellulare di 3×10^4 cellule/ml è stata seminata su piastre nere da coltura cellulare da 24 pozzetti. Le piastre sono state poi riposte nell'incubatore a umidità controllata per 24 ore al fine di permettere l'adesione cellulare.

Irradiazione laser

Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state irradiate con laser a diodi GaAlAs (Pocket Laser, Orotig s.r.l., Verona, Italy). Il dispositivo laser presentava una lunghezza d'onda di 915 ± 10 nm e una potenza massima in uscita di $6 \text{ W} \pm 20\%$. È stata utilizzata una fibra ottica da 0.6 mm di diametro con manipolo defocalizzante al fine di coprire l'area di crescita di ogni pozzetto (1.91 cm^2) ad una distanza di 19 mm. È stata impostata una frequenza di 100 Hz con un duty cycle del 50% e una potenza di 1 W, corrispondente ad una potenza in uscita di 0.575 W all'estremità del manipolo. È stata eseguita una singola applicazione laser per 10, 48, 96,

193 e 482 secondi, raggiungendo rispettivamente dosi di 1, 5, 10, 20, and 50 J/cm². L'irradiazione è stata eseguita perpendicolarmente ai pozzetti, dopo aver tolto il coperchio della piastra e in assenza di terreno di coltura per evitare interferenze col siero. Immediatamente prima della irradiazione, il DMEM è stato rimosso, è stata inserita la soluzione tampone fosfato (PBS, Sigma-Aldrich) e, subito dopo la irradiazione, è stata sostituita da terreno di coltura fresco. La stessa quantità di cellule è stata seminata nei pozzetti di controllo (CTR), i quali sono stati sottoposti alle stesse condizioni e tempi sperimentali, ad eccezione della irradiazione laser. Sono state utilizzate piastre multipozzetto nere al fine di evitare il rischio di cross-irradiazione tra i pozzetti e minimizzare la riflessione della luce. Le colture sono state mantenute a 37°C in atmosfera umida con 95% di aria e 5% di CO₂ per 1 ora, 1 giorno e 3 giorni. Ad ogni tempo sperimentale le colture sono state processate per la valutazione della vitalità (AlamarBlue, AbD Serotec, Oxford, UK) e la quantificazione del DNA (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA, Life Technologies, Carlsbad, California). I surnatanti cellulari sono stati raccolti e analizzati al fine di valutare la citotossicità (cytotoxicity Detection Kit, lactate dehydrogenase (LDH), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), il rilascio di vascular endothelial growth factor (VEGF, Boster Immunoleader ELISA kit, Fremont, California), osteoprotegerina (OPG) e receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) (Cloud-Clone Corp., Houston, Texas).

Vitalità cellulare

È stato utilizzato il test AlamarBlue per misurare quantitativamente la vitalità delle cellule Saos-2. Ad ogni tempo sperimentale il terreno di coltura è stato rimosso dai pozzetti, le cellule sono state lavate ripetutamente con PBS e, successivamente, 100 µl di soluzione

AlamarBlue diluita (concentrazione finale 1:10) sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate a 37°C per ulteriori 4 ore. La reazione colorimetrica è stata misurata spettrofotometricamente alle lunghezze d'onda di 570 e 625 nm con un lettore di micropiastre ad assorbanza (iMark, Biorad-Laboratories Inc., Hercules, California).

Quantificazione del DNA

I pozzetti sono stati ripetutamente lavati con PBS, le piastre sono state poi congelate a -80°C e scongelate a temperatura ambiente per tre volte. Per la completa lisi delle cellule e del loro contenuto, 100 µl di Tris-EDTA tamponato con una soluzione allo 0.01% di sodio dodecil solfato sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. La soluzione di lavoro del reagente PicoGreen® (Life Technologies, Carlsbad, California) è stata aggiunta e incubata con i campioni sperimentali al buio per 3 minuti a temperatura ambiente. La fluorescenza (eccitazione 490 nm - emissione 520 nm) è stata letta con fluorimetro per micropiastre e le letture espresse come unità di fluorescenza relativa e la quantità di DNA calcolata per ogni campione sulla curva standard.

Analisi di surnatanti

L'entità del danno cellulare è stato valutato misurando il rilascio di LDH dal citosol delle cellule danneggiate nei surnatanti cellulari usando LDH cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics GmbH). Brevemente, 100 µl di surnatanti di cellule esposte e non esposte al laser sono stati mescolati con 100 µl di miscela di reazione. Dopo una incubazione di 30 minuti al buio a temperatura ambiente, l'assorbanza ottica è stata misurata alla lunghezza d'onda di 490 nm con una correzione di riferimento a 625 nm con un lettore di micropiastre (iMark, Biorad-Laboratories Inc.).

Ad ogni tempo sperimentale, il rilascio di OPG, RANKL (Cloud-Clone Corp.) e VEGF (Boster Immunoleader ELISA kit) nel terreno di coltura è stato analizzato con i saggi immunoenzimatici secondo le istruzioni del produttore.

Morfologia cellulare

La morfologia cellulare a 1 e 3 giorni dalla irradiazione laser è stata valutata con il kit vitalità/citotossicità LIVE/DEAD®. Brevemente, le cellule sono state risciacquate in PBS e incubate con 150 µl di miscela di reazione (2 µM Calcein AM e 4 µM EthD-1) per 45 minuti al buio a temperatura ambiente. Successivamente, le cellule colorate sono state osservate al microscopio invertito a fluorescenza (IX71, Olympus Italia s.r.l, Milano, Italy) equipaggiato con un filtro idoneo alla simultanea visualizzazione di entrambe le sonde. Le immagini sono state acquisite con una camera digitale (XC30, Olympus Italia s.r.l).

Analisi statistica

I dati sono stati mostrati come media \pm deviazione standard (DS). Le differenze tra i protocolli di irradiazione laser sono state analizzate utilizzando il test H di Kruskal–Wallis e il test U di Mann–Whitney con correzione di Bonferroni come analisi post-hoc per ogni tempo sperimentale. Le differenze tra i tre tempi sperimentali sono state valutate con il test di Friedman seguito dal test di Wilcoxon con correzione di Bonferroni per ogni protocollo di irradiazione laser. Le analisi statistiche sono state eseguite il programma SPSS per Windows (versione 18.0; 2009; SPSS Inc., Chicago, Illinois). Il limite per la significatività statistica è stato impostato a $p < 0.05$.

RISULTATI

Vitalità cellulare

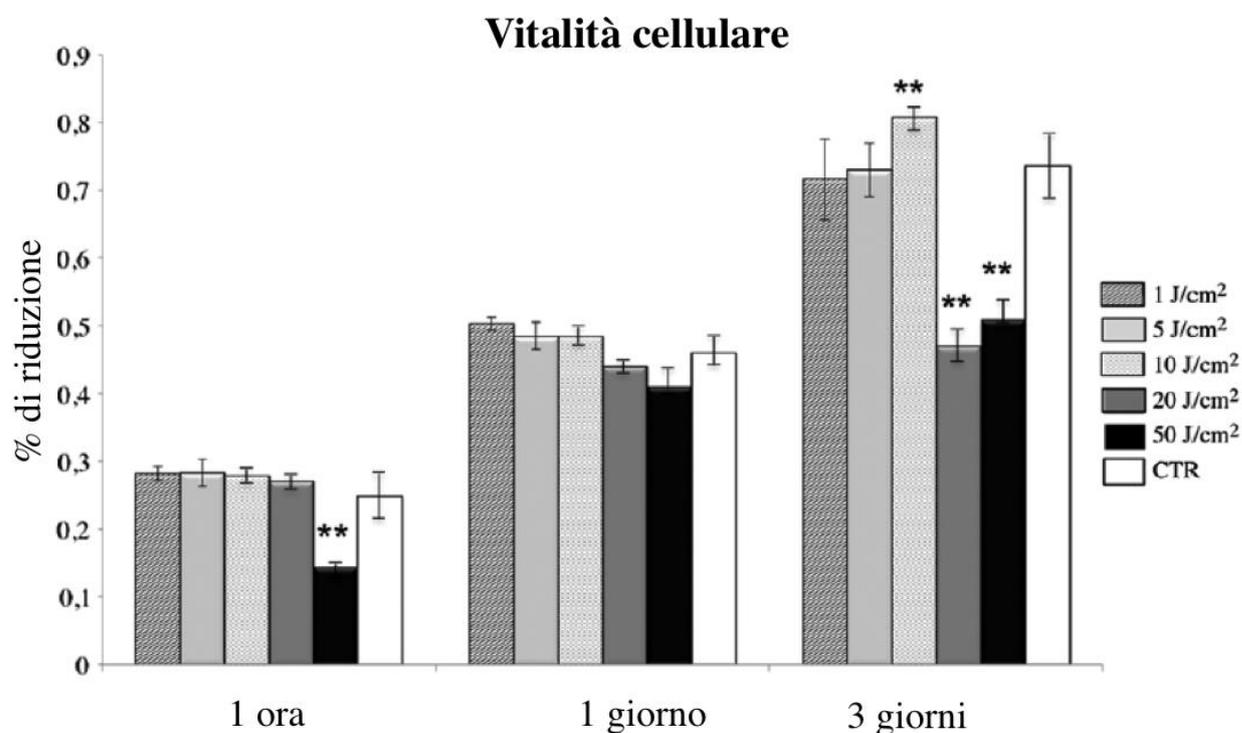


Fig. 1[§] Vitalità delle cellule Saos-2 sottoposte ad una singola irradiazione laser con diverse dosi (1, 5, 10, 20, 50 J/cm²) o non irradiate (controllo, CTR). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard. Test di Kruskal–Wallis seguito dal test U di Mann-Whitney con correzione di Bonferroni: 1 ora: **, 50 J/cm² versus CTR, $p < 0.005$; 3 giorni: **, 10, 20 e 50 J/cm² versus CTR, $p < 0.005$.

Una singola applicazione di laser ha influenzato le cellule già a 1 ora di distanza dalla irradiazione, con il gruppo 50 J/cm² che mostrava una ridotta vitalità cellulare rispetto ai controlli non irradiati ($p < 0.005$, Fig. 1). Dopo 3 giorni, i gruppi trattati con le dosi di 20 e 50 J/cm² presentavano una vitalità significativamente ridotta, mentre il gruppo 10 J/cm² mostrava una vitalità aumentata rispetto ai controlli non irradiati ($p < 0.005$, Fig. 1). Non

è stata trovata nessuna differenza statisticamente significativa tra i tre tempi sperimentali per ogni protocollo di irradiazione laser.

Quantificazione del DNA

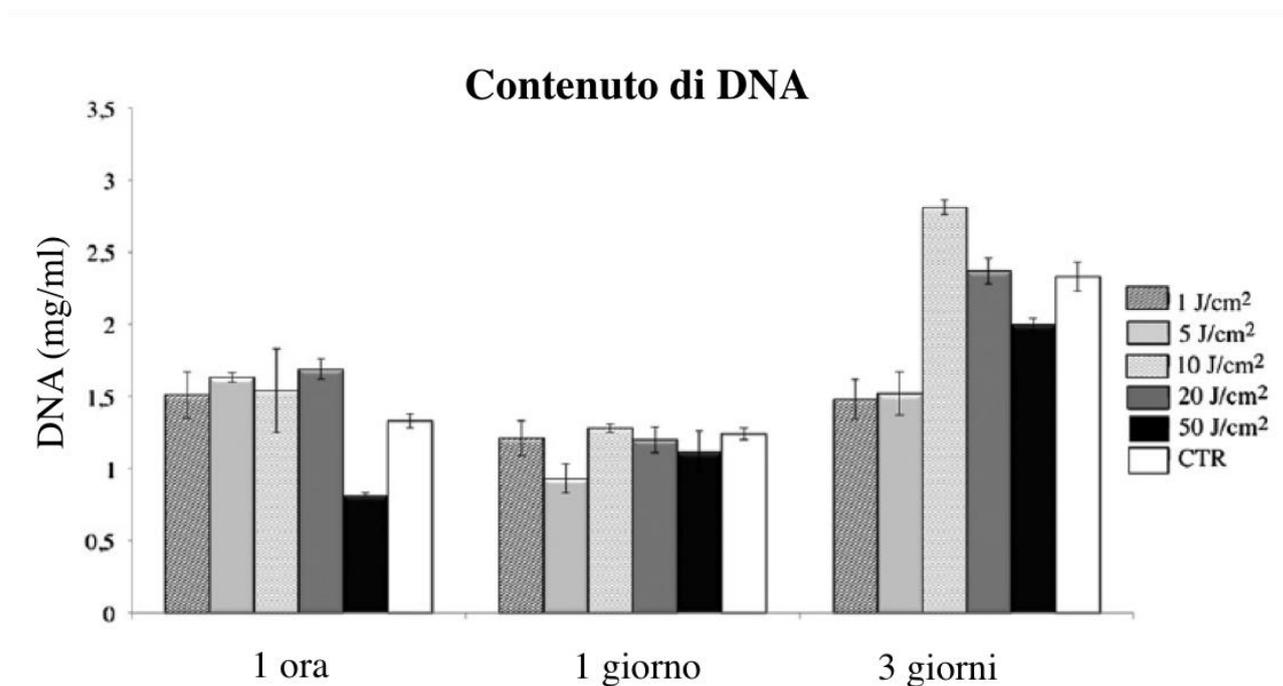


Fig.2[§] Quantificazione del contenuto di DNA delle cellule Saos-2 sottoposte ad una singola irradiazione laser con diverse dosi (1, 5, 10, 20, 50 J/cm²) o non irradiate (controllo, CTR). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard. Non sono state osservate differenze statisticamente significative.

Ad ogni tempo sperimentale era evidenziabile un tendenziale aumento nel contenuto di DNA per il gruppo irradiato con la dose di 10 J/cm² e una tendenziale riduzione per il gruppo irradiato con la dose di 50 J/cm² rispetto al gruppo di controllo non trattato, sebbene non vi fossero differenze statisticamente significative tra i gruppi (Fig. 2). In accordo con i risultati dei test sulla vitalità cellulare, questa tendenza era più evidente a 3 giorni di distanza dalla irradiazione laser. Non è stata osservata nessuna differenza

statisticamente significativa tra i tempi sperimentali per ogni protocollo di irradiazione laser.

Analisi dei surnatanti

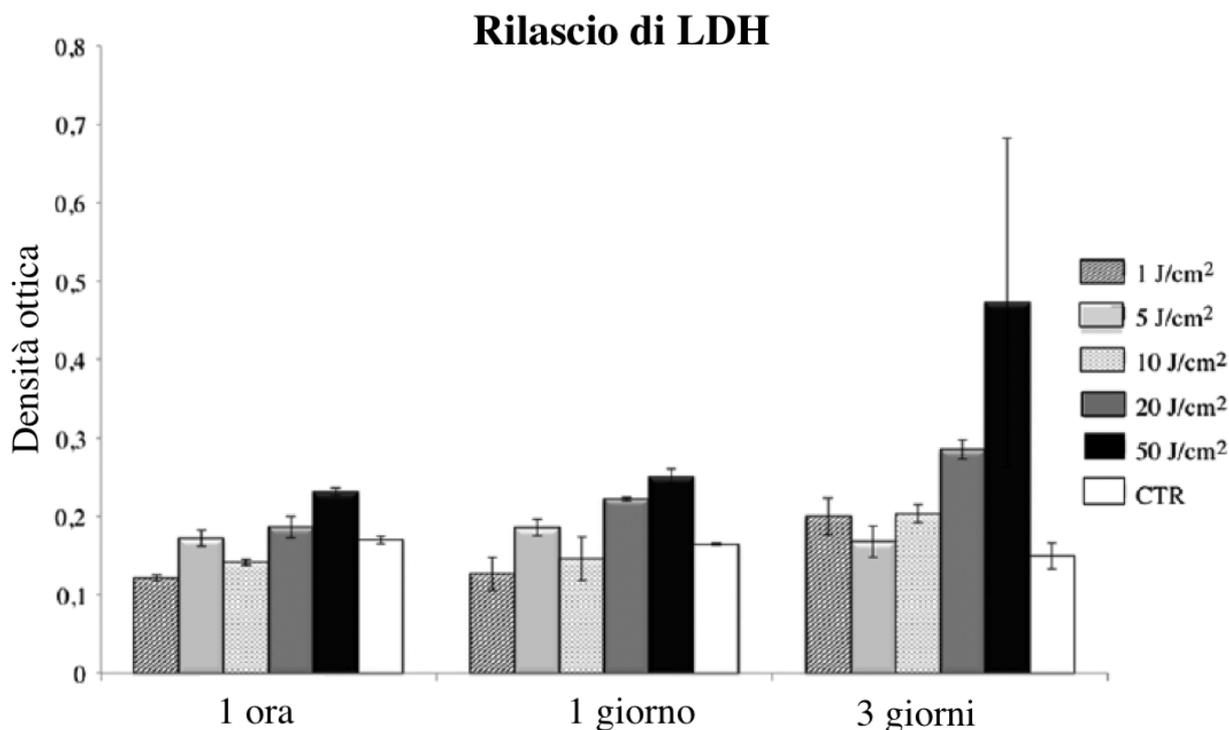


Fig. 3[§] Rilascio di lattato deidrogenasi (LDH) da parte delle cellule Saos-2 sottoposte ad una singola irradiazione laser con diverse dosi (1, 5, 10, 20, 50 J/cm²) o non irradiate (controllo, CTR). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard. Non sono state osservate differenze statisticamente significative.

Sebbene le differenze tra i gruppi non fossero statisticamente significative, ad ogni tempo sperimentale l'irradiazione laser singola con una dose di 50 J/cm² mostrava una tendenza a un aumentato rilascio di LDH, che è un indicatore di danno cellulare, rispetto al gruppo di controllo non trattato (Fig. 3). Lo stesso trend è stato osservato anche per il gruppo irradiato con la dose 20 J/cm². Le altre dosi (1, 5 e 10 J/cm²) presentavano livelli di LDH paragonabili o inferiori rispetto ai controlli. Non è stata osservata nessuna

differenza statisticamente significativa tra i tempi sperimentali per ogni protocollo di irradiazione laser.

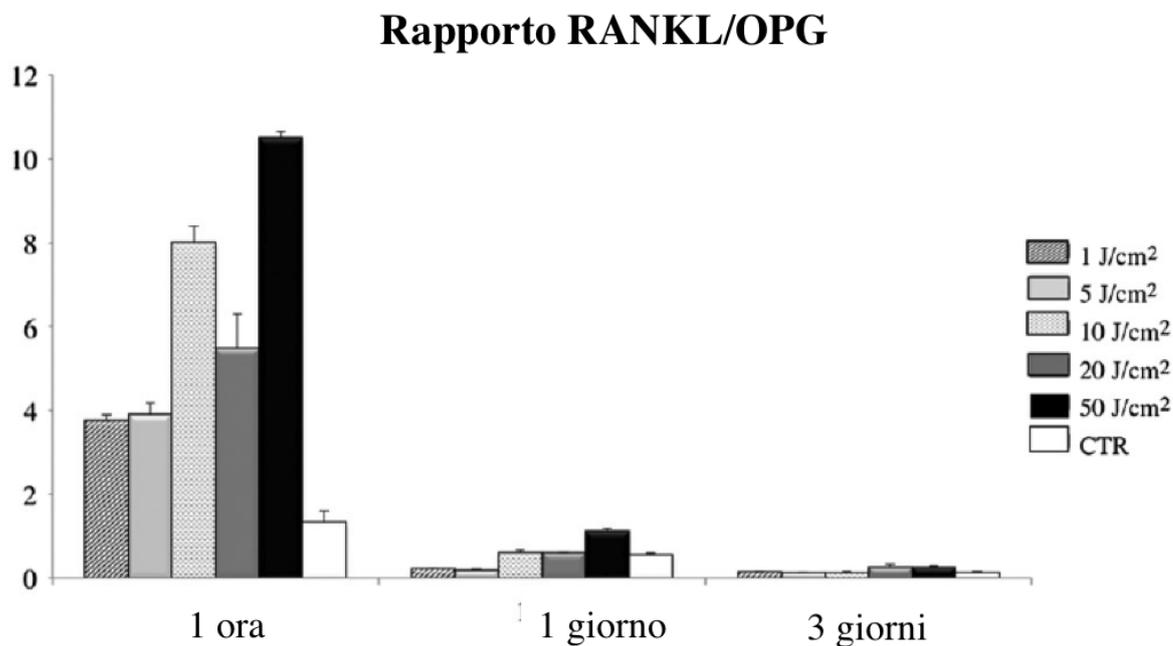


Fig. 4^s Rapporto tra RANKL/OPG per le cellule Saos-2 sottoposte ad una singola irradiazione laser con diverse dosi (1, 5, 10, 20, 50 J/cm²) o non irradiate (controllo, CTR). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard. Non sono state osservate differenze statisticamente significative.

Generalmente, dopo 1 ora, tutte le cellule sottoposte a irradiazione laser rispondevano allo stimolo biofisico con un aumento del rapporto tra RANKL/OPG, effetto che, in assenza di uno stimolo ripetuto, scompariva nei successivi tempi sperimentali (Fig. 4). Sebbene le differenze tra i gruppi non fossero statisticamente significative, il rapporto tra RANKL/OPG era generalmente aumentato nel gruppo trattato con la dose di 50 J/cm² rispetto ai controlli non trattati. Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa tra i tempi sperimentali per ogni protocollo di irradiazione laser.

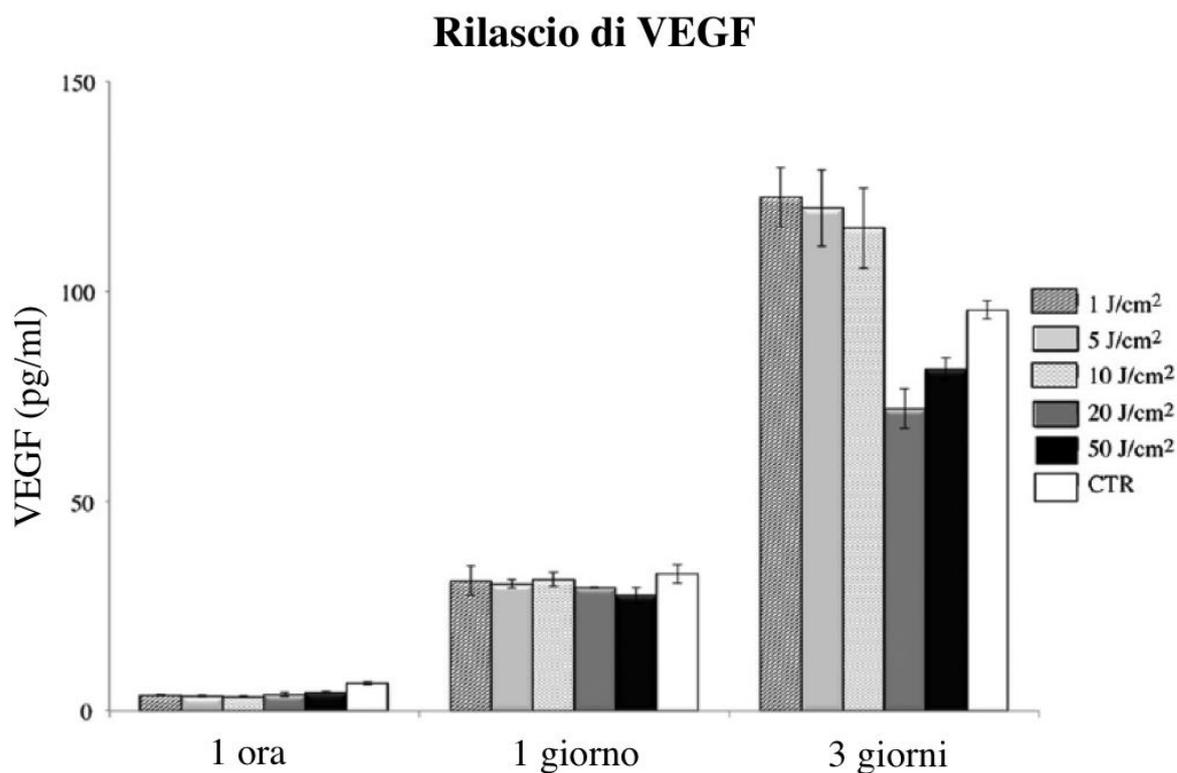


Fig. 5^s Rilascio di VEGF da parte delle cellule Saos-2 sottoposte ad una singola irradiazione laser con diverse dosi (1, 5, 10, 20, 50 J/cm²) o non irradiate (controllo, CTR). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard. Non sono state osservate differenze statisticamente significative.

Il rilascio di VEGF mostrava una tendenza a una risposta dose-dipendente e ritardata dopo una singola irradiazione laser, con le dosi 1, 5 e 10 J/cm² che inducevano un leggero aumento e le dosi di 20 e 50 J/cm² che inducevano un leggero decremento dopo 3 giorni rispetto ai controlli non trattati, sebbene in assenza di differenze statisticamente significative (Fig. 5).

Morfologia cellulare

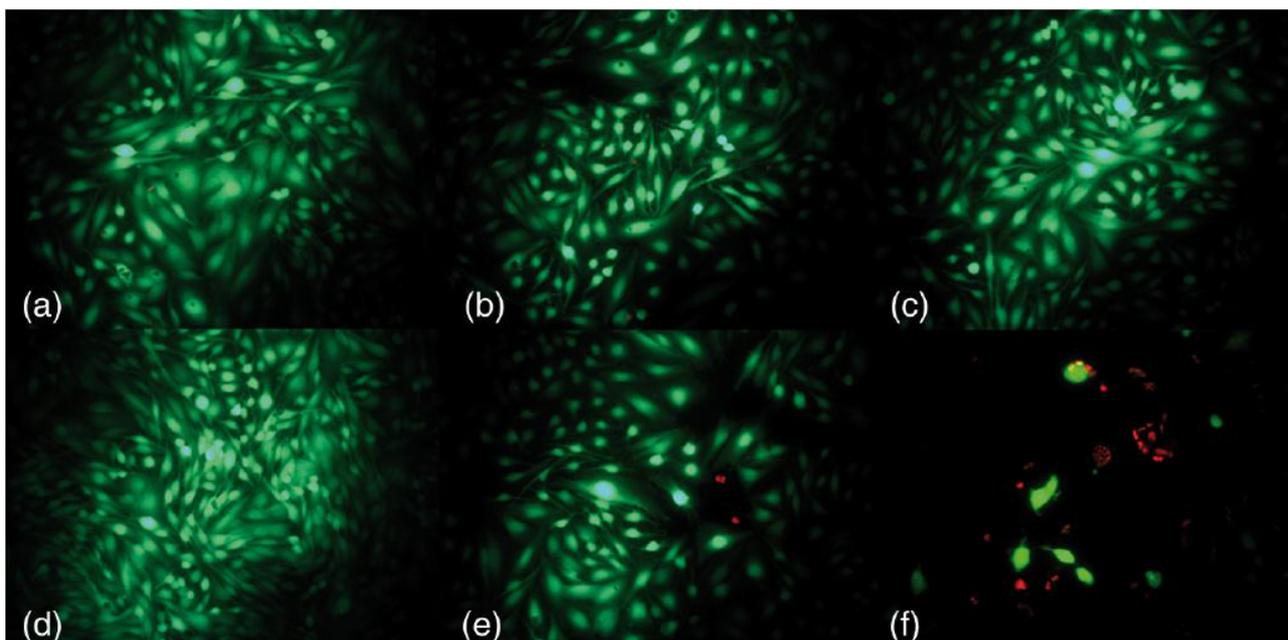


Fig. 6^s Caratterizzazione morfologica con sonde fluorescenti (colorazione live/dead) che evidenzia le cellule vitali (colorazione verde) e quelle morte (colorazione rossa) (ingrandimento 10X): (a) cellule non irradiate; (b) cellule irradiate con dose di 1 J/cm^2 ; (c) cellule irradiate con dose di 5 J/cm^2 ; (d) cellule irradiate con dose di 10 J/cm^2 ; (e) cellule irradiate con dose di 20 J/cm^2 ; (f) cellule irradiate con dose di 50 J/cm^2 .

La Figura 6 mostra la morfologia delle cellule a 3 giorni di distanza dalla irradiazione laser. Le cellule trattate con laser alle dosi di 1 , 5 e 10 J/cm^2 erano per lo più vitali e paragonabili ai controlli e mostravano uno stato vicino alla confluenza. Al contrario, le cellule trattate con la dose di 50 J/cm^2 apparivano per lo più colorate di rosso, indicando un progressivo stato apoptotico, mentre le cellule trattate con la dose 20 J/cm^2 apparivano vitali ma ad uno stadio minore di confluenza e con parecchie cellule in apoptosi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo primo studio è stato osservato un effetto precoce sulla vitalità cellulare a distanza di 1 ora da una singola irradiazione laser, con il gruppo trattato con dose 50 J/cm^2 che mostrava una ridotta vitalità rispetto al controllo non irradiato. Questo risultato era più evidente a 3 giorni di distanza dalla irradiazione: una ridotta vitalità è stata osservata per i gruppi trattati con dosi di 20 e 50 J/cm^2 rispetto ai controlli non irradiati, mentre il gruppo trattato con dose di 10 J/cm^2 presentava una vitalità significativamente maggiore rispetto al controllo. Questi dati supportano l'idea che *l'irradiazione laser a basse dosi* comprese tra 1 e 10 J/cm^2 induca una *risposta cellulare biostimolante*, mentre *dosi più alte* determinino *un effetto bioinibitorio*.¹

Gli studi in letteratura sugli effetti della irradiazione laser su cellule osteoblastiche riportano invece risultati controversi: alcuni autori hanno trovato un significativo aumento nella loro proliferazione,²⁻⁴ mentre altri no.⁵⁻⁸ Tuttavia, un paragone diretto con il nostro studio non è appropriato a causa dei diversi dispositivi laser, protocolli di trattamento, modelli *in vitro* e condizioni sperimentali utilizzati. Nessuno degli studi precedenti ha confermato i risultati dei test di vitalità con la quantificazione del DNA dopo avere irradiato con il laser cellule Saos-2. Nel nostro studio, sebbene le differenze tra i gruppi non fossero statisticamente significative, ad ogni tempo sperimentale è stata evidenziata una tendenza all'aumentato contenuto di DNA per il gruppo 10 J/cm^2 e al ridotto contenuto di DNA per il gruppo 50 J/cm^2 rispetto ai controlli non irradiati. Questo trend era in linea con i risultati dei test di vitalità cellulare e, allo stesso modo, era più evidente a 3 giorni di distanza dalla irradiazione. L'ipotesi di un effetto bioinibitorio per la dose 50 J/cm^2 è stata ulteriormente confermata dalle

immagini morfologiche che, specialmente a 3 giorni, mostravano una grande maggioranza di cellule morte e dall'incremento nel rilascio di LDH rispetto ai controlli non irradiati, fatto indicativo di citotossicità. Anche la dose di 20 J/cm² ha evidenziato una tendenza alla citotossicità a causa dell'aumentato rilascio di LDH rispetto ai controlli per ogni tempo sperimentale, mentre le dosi 1, 5 e 10 J/cm² presentavano livelli di LDH paragonabili a quelli dei controlli e, quindi, non evocavano alcun effetto citotossico.

Nel nostro studio è stato esaminato anche il rapporto tra RANKL/OPG, fattori in grado di favorire rispettivamente il riassorbimento o la deposizione di tessuto osseo nel processo di rimodellamento. L'attivazione del ciclo di rimodellamento inizia con l'aumento dell'espressione del RANKL da parte degli osteoblasti. L'accoppiamento col rispettivo recettore RANK, che trova una elevata espressione sulla membrana degli osteoclasti, porta alla espansione del pool di progenitori degli osteoclasti, all'aumento della sopravvivenza di queste cellule, alla differenziazione in cellule progenitrici mononucleate, alla fusione in osteoclasti multinucleati e alla loro attivazione. Contemporaneamente, gli osteoblasti possono bilanciare questo processo modulando l'espressione dell'OPG, un recettore solubile. L'OPG è un inibitore del recettore RANK. Questo riduce l'effetto del RANKL sulla osteoclastogenesi e costituisce un efficiente meccanismo di regolazione negativa.⁹

Nonostante non vi fossero differenze statisticamente significative tra i gruppi, è stata osservata una tendenza verso un aumento del rapporto tra RANKL/OPG nel gruppo irradiato con la dose 50 J/cm² rispetto ai controlli non irradiati ad ogni tempo sperimentale. I nostri dati mostrano come trend generale un rapido e transitorio aumento del rapporto tra RANKL/OPG per tutte le dosi dopo una singola irradiazione laser. Solo due studi *in vitro*

hanno analizzato l'espressione del rapporto tra RANKL/OPG dopo irradiazione laser, con risultati contrastanti. Il primo studio ha trovato un aumento del rapporto tra RANKL/OPG in cellule umane derivate dall'osso alveolare seminate su dischi di titanio e irradiate con una dose di 3 J/cm^2 impiegando un laser a diodi GaAlAs con una lunghezza d'onda di 780nm .¹⁰ Il secondo studio ha evidenziato una riduzione del rapporto tra RANKL/OPG in cellule derivate dalla calvaria di ratto irradiate con laser a diodi con una lunghezza d'onda di 650nm .¹¹ Tuttavia, i risultati del nostro studio sembrano confermare i dati di studi preclinici e clinici nei quali un aumento del rapporto tra RANKL/OPG era stato osservato in ratti e pazienti trattati con laser portando ad una accelerazione del rimodellamento osseo.¹²⁻¹⁴

Nel presente studio è stato valutato il rilascio di VEGF, in quanto esso è un potente fattore di crescita e promuove la vascolarizzazione, che è parte integrante del rimodellamento osseo.¹⁵ La produzione di VEGF da parte degli osteoblasti induce proliferazione delle cellule endoteliali, angiogenesi e permeabilità capillare, agisce come potente fattore di richiamo per osteoblasti e osteoclasti e può direttamente aumentare il riassorbimento osseo e la sopravvivenza degli osteoclasti.¹⁵ Nel presente studio è stato osservato un trend di aumentato rilascio di VEGF per i gruppi irradiati con dosi di $1, 5$ e 10 J/cm^2 e una tendenza ad un rilascio ridotto di VEGF per i gruppi irradiati con dosi di 20 e 50 J/cm^2 rispetto al controllo tre giorni dopo l'irradiazione. Pochi studi *in vitro* hanno analizzato finora il rilascio di VEGF dopo irradiazione laser su diversi fenotipi cellulari come le cellule endoteliali umane, cellule muscolari lisce, cardiomiociti, fibroblasti gengivali e del derma, cellule mesenchimali derivate dal midollo osseo o cellule gliali olfattive.¹⁶⁻²² Nessun studio ha indagato gli effetti del laser sull'espressione del VEGF usando cellule simil-osteoblastiche. Si può

ipotizzare, a seguito dei nostri risultati, che una singola irradiazione laser moduli il rilascio di VEGF in maniera dose dipendente e ritardata.

I nostri dati mostrano inoltre che la vitalità delle cellule Saos-2 è modulata da una singola irradiazione laser in maniera dose dipendente. La dose 10 J/cm² induce una risposta biostimolante mentre le dosi 20 e 50 J/cm² determinano una risposta bioinibitoria. Ulteriori ricerche con irradiazioni laser multiple ed osservazioni con tempi sperimentali più lunghi potrebbero rendere la risposta cellulare più evidente e i risultati più significativi rispetto a quelli di una singola irradiazione grazie ad un effetto “cumulativo” del laser.^{2,8,23-25} Questo consentirebbe di stabilire il regime di trattamento ideale in laboratorio e nella pratica clinica. La linea cellulare Saos-2 è stata scelta in questo studio perchè presenta un comportamento molto simile a quello degli osteoblasti umani primari maturi in termini di mineralizzazione della matrice, produzione e rilascio di citochine e fattori di crescita,²⁶ e per ovviare alla variabilità delle cellule primarie. Il laser GaAlAs è stato selezionato perchè è uno dei più popolari nella pratica clinica³ e, ad una lunghezza di 915 nm, presenta una profondità di penetrazione maggiore rispetto ad altre tipologie di laser.¹ Obiettivo del nostro studio era di determinare la dose ottimale di irradiazione laser per ottenere un effetto biostimolante sugli osteoblasti per un utile e sicuro impiego nella pratica clinica. E' stato quindi deciso di mantenere costante la potenza, la frequenza della irradiazione e l'area trattata, impiegando la dose come unica variabile perchè essa è stata riconosciuta come il più importante parametro responsabile della risposta biologica.²⁷ Questo studio rappresenta un primo passo verso ulteriori indagini sulle potenzialità della LLLT sulle cellule ossee per colmare il vuoto tra la ricerca *in vitro* e le applicazioni biomediche. La dose più biostimolante emersa da questo studio, pari a 10 J/cm², potrà essere utilizzata in studi con co-culture di

osteoblasti e osteoclasti al fine di migliorare le conoscenze sull'effetto del laser sul rimodellamento osseo.

I risultati ottenuti in questo studio sono stati oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. J Biomed Opt 2014;19(10):108002.

§ Tutte le figure presenti in questo capitolo sono state tratte dall'articolo: Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. J Biomed Opt 2014;19(10):108002.

Bibliografia

1. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2012;27:237-49.
2. Bloise N, Ceccarelli G, Minzioni P, Vercellino M, Benedetti L, De Angelis MG, Imbriani M, Visai L. Investigation of low-level laser therapy potentiality on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in the absence/presence of osteogenic factors. *J Biomed Opt* 2013;18:128006.
3. Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, García-Martínez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs* 2014;16:191-6.
4. Arisu HD, Türköz E, Bala O. Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci* 2006;21:175-80.
5. Chellini F, Sassoli C, Nosi D, Deledda C, Tonelli P, Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Giannelli M. Low pulse energy Nd:YAG laser irradiation exerts a biostimulative effect on different cells of the oral microenvironment: "an in vitro study". *Lasers Surg Med* 2010;42:527-39.
6. Stein E, Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Lezaic V, Wendtlandt G, Watzinger F, Turhani D. Phenothiazine chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg* 2009;27:71-7.
7. Bayram H, Kenar H, Taşar F, Hasırcı V. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013;42:140-6.
8. Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 2001;4:3-14.

9. Fini M, Carpi A, Borsari V, Tschon M, Nicolini A, Sartori M, Mechanick J, Giardino R. Bone remodeling, humoral networks and smart biomaterial technology for osteoporosis. *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;2:468-82.
10. Petri AD, Teixeira LN, Crippa GE, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Braz Dent J* 2010;21:491-8.
11. Xu M, Deng T, Mo F, Deng B, Lam W, Deng P, Zhang X, Liu S. Low-intensity pulsed laser irradiation affects RANKL and OPG mRNA expression in rat calvarial cells. *Photomed Laser Surg* 2009;27:309-15.
12. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res* 2008;11:143-55.
13. Altan BA, Sokucu O, Ozkut MM, Inan S. Metrical and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci* 2012;27:131-40.
14. Domínguez A, Gómez C, Palma JC. Effects of low-level laser therapy on orthodontics: rate of tooth movement, pain, and release of RANKL and OPG in GCF. *Lasers Med Sci* 2015;30:915-23.
15. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24:297-310.
16. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg Med* 2008;40:726-33.
17. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, Zalewski P, Newton JL, Gryko L, Zajac A, Rosc D. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of

- endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:387-91.
- 18.Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, Shankar LR, Khanna A, Kornowski R, Leon M, Moses J. Low-power helium: neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med* 2001;28:355-64.
- 19.Hakki SS, Bozkurt SB. Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 2012;27:325-31.
- 20.Byrnes KR, Wu X, Waynant RW, Ilev IK, Anders JJ. Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. *Lasers Surg Med* 2005;37:161-71.
- 21.Feng J, Zhang Y, Xing D. Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cell Signal* 2012;24:1116-25.
- 22.Khanna A, Shankar LR, Keelan MH, Kornowski R, Leon M, Moses J, Kipshidze N. Augmentation of the expression of proangiogenic genes in cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro. *Cardiovasc Radiat Med* 1999;1:265-9.
- 23.Jawad MM, Husein A, Azlina A, Alam MK, Hassan R, Shaari R. Effect of 940 nm low-level laser therapy on osteogenesis in vitro. *J Biomed Opt* 2013;18:128001.
- 24.Bouvet-Gerbettaz S, Merigo E, Rocca JP, Carle GF, Rochet N. Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg Med* 2009;41:291-7.

-
25. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci* 2012;27:423-30.
26. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:2636-43.
27. Tuner J and Hode L, *The Laser Therapy Handbook*, 4th ed., Prima Books AB, Grangesberg, Sweden (2004).

MATERIALE E METODI

Colture cellulari

Cellule umane simil-osteoblastiche Saos-2 (ATCC® HTB-85™) sono state coltivate in terreno di coltura Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) addizionato di siero bovino fetale al 10% (Lonza Walkersville Inc., Walkersville), 100 IU/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina in soluzione (Gibco Invitrogen SRL, San Giuliano Milanese, MI, Italy). Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate dalla piastra di coltura mediante trattamento con una miscela di tripsina allo 0.05% (w/v) e di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) allo 0.02% (w/v), sono state contate e seminate su piastre nere da coltura cellulare da 24 pozzetti con il fondo trasparente (STEPBIO S.r.l., Bologna, Italy) ad una densità di 2.6×10^4 cellule/cm². Le piastre sono state poi riposte nell'incubatore a umidità controllata (37°C, 95% aria/5% CO₂).

Modello *in vitro* di microferita

Dopo il raggiungimento della confluenza cellulare è stata creata una microferita strisciando sul pozzetto di coltura un puntale sterile Eppendorf da 200 µm, determinando la formazione di una zona priva di cellule nel monostrato (al tempo zero, T₀, l'area della ferita misurava 7.2 ± 0.4 mm²). Le cellule sono state ripetutamente lavate con soluzione tampone fosfato (PBS; Gibco Invitrogen SRL, San Giuliano Milanese, Milan) e poi sottoposte a irradiazione laser. Al fine di poter discriminare il contributo della proliferazione da quello della migrazione cellulare nel processo di chiusura della microferita, metà dei pozzetti sono stati trattati con un

inibitore della proliferazione cellulare (mitomicina C, MMC, Sigma-Aldrich) ad una concentrazione di 50 ng/ml. Le colture cellulari sono state incubate e osservate al microscopio invertito (Nikon Eclipse Ti-U, Nikon Italia, Italy) equipaggiato di una fotocamera digitale (Sight DS-Fi2, Nikon Italia, Italy) dopo 4, 24, 48, 72 e 96 ore dalla irradiazione laser. Ogni pozzetto è stato fotografato a ingrandimento 4X per coprire l'area della microferita. È stato utilizzato il programma di acquisizione delle immagini (NiS Elements Advanced Research, Nikon Italia, Italy) per misurare l'area della zona priva di cellule della microferita creata artificialmente.

Irradiazione laser

Le cellule sono state sottoposte a irradiazione con laser a diodi GaAlAs (Pocket Laser, Orotig s.r.l., Verona, Italy), che ha una lunghezza d'onda di 915 ± 10 nm e una potenza massima in uscita di $6 \text{ W} \pm 20\%$. Sono stati utilizzati una frequenza di 100 Hz, un duty cycle del 50% e una potenza di 1 W (corrispondente ad una potenza in uscita di 0.575 W, misurata all'estremità del manipolo) per 48, 96 e 144 secondi. Le dosi somministrate erano, rispettivamente, di 5, 10 e 15 J/cm^2 . È stato utilizzato un manipolo defocalizzato con fibra ottica da 0.6 mm di diametro al fine di coprire l'area di crescita di ogni pozzetto (1.91 cm^2) ad una distanza di 19 mm. Per evitare il rischio di irradiazione crociata, sono state utilizzate piastre da coltura nere. L'irradiazione è stata eseguita mantenendo il manipolo in posizione perpendicolare rispetto all'imbocco dei pozzetti, dopo aver rimosso il coperchio della piastra da coltura e dopo avere sostituito il DMEM con PBS (Sigma-Aldrich) per evitare interferenze col siero.¹ Le cellule del gruppo controllo non sono state irradiate. Sia le cellule irradiate che quelle non irradiate sono state coltivate usando le stesse condizioni sperimentali.

Vitalità cellulare e quantificazione del DNA

È stato utilizzato il test AlamarBlue (AbD Serotec, Oxford, United Kingdom) per valutare la vitalità cellulare dopo 24, 48 e 72 ore dalla irradiazione laser. La soluzione Alamar è stata aggiunta a ogni pozzetto (1:10 v/v) e le piastre da coltura sono state incubate a 37°C per 4 ore. La reazione colorimetrica è stata misurata spettrofotometricamente sui surnatanti alle lunghezze d'onda di 570 e 625 nm con un lettore di micropiastre (iMark, Biorad-Laboratories Inc., Hercules, California).

La quantificazione del DNA (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA) è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore. Brevemente, le cellule sono state ripetutamente lavate con PBS, congelate a -80°C e scongelate a temperatura ambiente per tre volte. La lisi cellulare è stata ottenuta aggiungendo 100 µl di Tris-EDTA tamponato con una soluzione allo 0.01% di sodio dodecil solfato. La soluzione di lavoro del reagente PicoGreen® è stata aggiunta e incubata con i lisati cellulari al buio per 3 minuti a temperatura ambiente. La fluorescenza (eccitazione 490nm - emissione 520nm) è stata letta con fluorimetro per micropiastre e le letture espresse come unità di fluorescenza relativa e la quantità di DNA calcolata per ogni campione sulla curva standard.

Quantificazione dei livelli di espressione di mRNA tramite PCR

Dopo 24, 48 e 72 ore dalla irradiazione laser, le cellule Saos-2 cresciute in presenza di DMEM (10% siero fetale bovino, 1% penicillina-streptomomicina e plasmocina) sono state lisate ed è stata eseguita l'estrazione dell'RNA totale usando il Mini Kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore. L'RNA totale è stato diluito con acqua RNase-

free, quantificato con il NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts), e mantenuto a -80°C fino alla trascrizione inversa.

Ogni campione di RNA (2500 ng) è stato retrotrascritto a cDNA usando il kit Super Script VILO cDNA Synthesis (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore e diluito alla concentrazione finale di $5\text{ ng}/\mu\text{l}$. La quantificazione dell'espressione genica per il collagene di tipo alpha 1 (COL1A1), il transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1), l'interleuchina 1 beta (IL1beta), la metalloproteasi di matrice 1 (MMP1), e la gliceraldeide 3 fosfato deidrogenasi (GAPDH) (usata come gene di riferimento) è stata eseguita in un LightCycler Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) usando il Quanti Tect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). I dettagli dei primer sono riportati in Tabella 1. Il protocollo includeva:

- denaturazione a 95°C per 15 minuti;
- da 25 e 45 cicli di amplificazione (95°C , 15 secondi, appropriata temperatura di annealing per ogni gene target per 20 secondi e 72°C per 20 secondi);
- analisi della curva di melting per verificare la specificità dell'amplificato.

Ogni campione è stato testato in duplicato. I dati sono stati raccolti usando il programma LightCycler Software 4.1. La quantificazione relativa è stata eseguita usando il “comparative threshold (Ct) method (ΔCt)”, in cui i livelli di espressione genica relativa sono quantificati attraverso l'equazione $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. I livelli di espressione genica dei geni target sono stati calcolati normalizzando per il gene di riferimento (GAPDH), usando le cellule non trattate come calibratore.

Tabella I. § Specifiche dei primer.

Gene	Alias	Primer Fw (5' → 3')	Primer Rv (5' → 3')	T annealing	Product length	Target
<i>GAPDH</i> ^a	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGGTATCGTGGAAGGACTCA	GCAGGGATGATGTTCTGGA	55°C	123 bp	NM_001289746.1 NM_001289745.1 NM_001256799.2 NM_002046.5
<i>COL1A1</i> ^b	Collagen, type I, alpha		Hs_COL1A1_1_SG	55°C	118 bp	NM_000088
<i>TGFbeta1</i> ^b	Transforming growth factor, beta 1		Hs_TGFB1_1_SG	55°C	108 bp	NM_000660
<i>IL1beta</i> ^b	Interleukin 1, beta		Hs_IL1B_1_SG	55°C	117 bp	NM_000576
<i>MMP1</i> ^c	Matrix metalloproteinase 1	TGGACCTGGAGGAAATCTTG	CCGCAACACGATGTAAGTTG	56°C	125 bp	NM_001145938.1 NM_002421.3 NM_133636.3 NM_001297756.1 NM_001297757.1

^a Designed with Primer Blast (Ye et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinf 2012;13:134); ^b QuantiTect Primer Assay – Qiagen; ^c Cavallo et al. Chondrocytes from patients with osteoarthritis express typical extracellular matrix molecules once grown onto a three-dimensional hyaluronan-based scaffold. J Biomed Mater Res A 2010;93(1):86–95.

Saggi immunoenzimatici

Dopo 24, 48 e 72 ore dalla irradiazione laser, sono stati raccolti i surnatanti cellulari per la determinazione tramite saggi immunoenzimatici del collagene di tipo 1 (COLL1), del TGFbeta1 e della prostaglandina E2 (PGE2) seguendo le istruzioni dei produttori (R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, per PGE2 e Boster Biological Technology Co, Fremont, California, per le altre proteine). Per i saggi sul TGFbeta1, i surnatanti sono stati attivati chimicamente prima delle analisi tramite due passaggi successivi: 1 N HCl per 10 minuti seguito da 1.2 N NaOH con 0.5 M HEPES per 10 minuti.

Le concentrazioni di proteine misurate sono state normalizzate per il contenuto di DNA.

Analisi statistica

La normalità dei dati è stata valutata con il test di Shapiro-Wilk. Per area della microferita, vitalità cellulare, espressione genica di *COL1A1* e *TGFbeta1*, le differenze tra i protocolli di irradiazione laser per ogni tempo sperimentale sono state analizzate usando l'analisi multivariata della varianza (MANOVA) e il test di Tukey come *post hoc*, mentre le differenze tra i tempi sperimentali sono state valutate con l'ANOVA per misure ripetute e test *post-hoc* con correzione di Bonferroni. Per il contenuto di DNA, rilascio di *COLL1* e *TGFbeta1*, le differenze tra i protocolli di irradiazione laser per ogni tempo sperimentale sono state analizzate con il test di Kruskal–Wallis e il test di Mann–Whitney con correzione di Bonferroni come *post hoc*, mentre le differenze tra i tempi sperimentali sono state valutate con il test di Friedman seguito dal test di Wilcoxon con correzione di Bonferroni per ogni protocollo di irradiazione laser. Tutti i paragoni sono stati eseguiti tra gruppi irradiati e non irradiati; i paragoni tra i gruppi irradiati sono stati analizzati solo se i primi erano significativi. Le analisi statistiche sono state eseguite il programma SPSS per Windows (versione 18.0; 2009; SPSS Inc., Chicago, Illinois). Il limite per la significatività statistica è stato impostato a $p < 0.05$.

RISULTATI

Microferita *in vitro*

Le cellule hanno contribuito al processo di guarigione, consentendo una graduale chiusura della ferita (Fig. 1). I gruppi irradiati con le dosi di 5 e 10 J/cm² sono stati i primi a raggiungere la completa chiusura della ferita dopo 72 ore, seguiti dal gruppo irradiato con la dose di 15 J/cm² a 96 ore dalla

irradiazione. I controlli non irradiati mostravano ancora una parziale chiusura della ferita dopo 96 ore (Fig. 1).

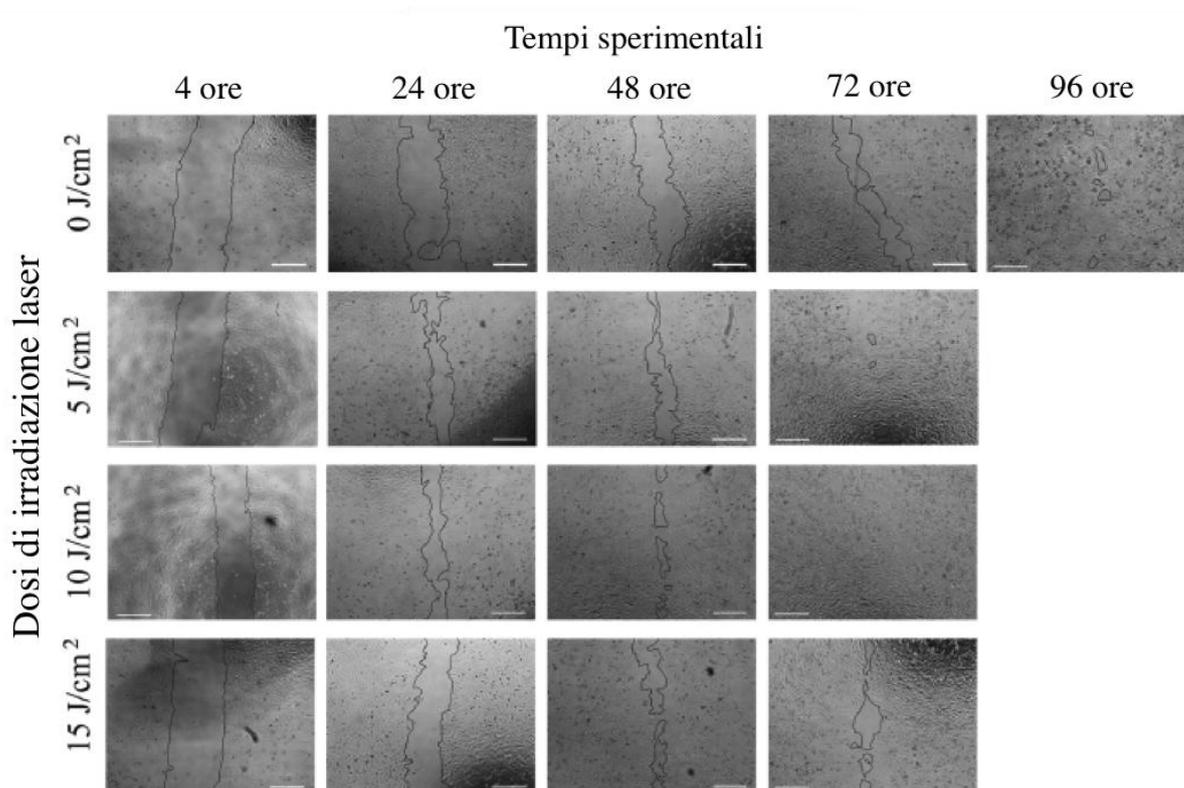


Fig. 1⁸ Immagini rappresentative della microferita *in vitro* su cellule Saos-2 trattate con differenti dosi di irradiazione laser (5, 10, 15 J/cm²) o non trattate (0 J/cm²) a differenti tempi sperimentali (4, 24, 48, 72 e 96 ore). Le linee nere delimitano l'area della microferita. Barra = 500 μm.

Dopo 4 ore, i gruppi irradiati con le dosi di 5 e 10 J/cm² mostravano una riduzione statisticamente significativa dell'area della microferita rispetto ai controlli non irradiati ($p < 0.0005$, Fig. 2). Dopo 48 e 72 ore, tutti i gruppi irradiati con laser presentavano una riduzione statisticamente significativa dell'area della microferita rispetto ai controlli ($p < 0.0005$ per tutti, eccetto per 15 J/cm² versus 0 J/cm² a 72 ore, con $p = 0.001$, Fig. 2) con un effetto dose-dipendente specialmente a 48 ore (15 J/cm² versus 5 e 10 J/cm² con una significatività di $p < 0.0005$ e $p = 0.001$ rispettivamente, Fig. 2).

Analizzando i dati tra i diversi tempi sperimentali, il gruppo irradiato con la dose di 5 J/cm^2 e il controllo non irradiato mostravano una riduzione statisticamente significativa dell'area della microferita tra le 4 e le 72 ore ($p=0.008$, Fig. 2); è stata inoltre osservata una riduzione dell'area della microferita nel gruppo controllo tra le 4 e le 24 ore ($p=0.008$, Fig. 2). Il gruppo irradiato con la dose di 10 J/cm^2 mostrava una riduzione statisticamente significativa dell'area della microferita quasi a ogni tempo sperimentale (4 ore versus 48 e 72 ore, $p=0.003$; 48 ore versus 72 ore, $p=0.002$, Fig. 2).

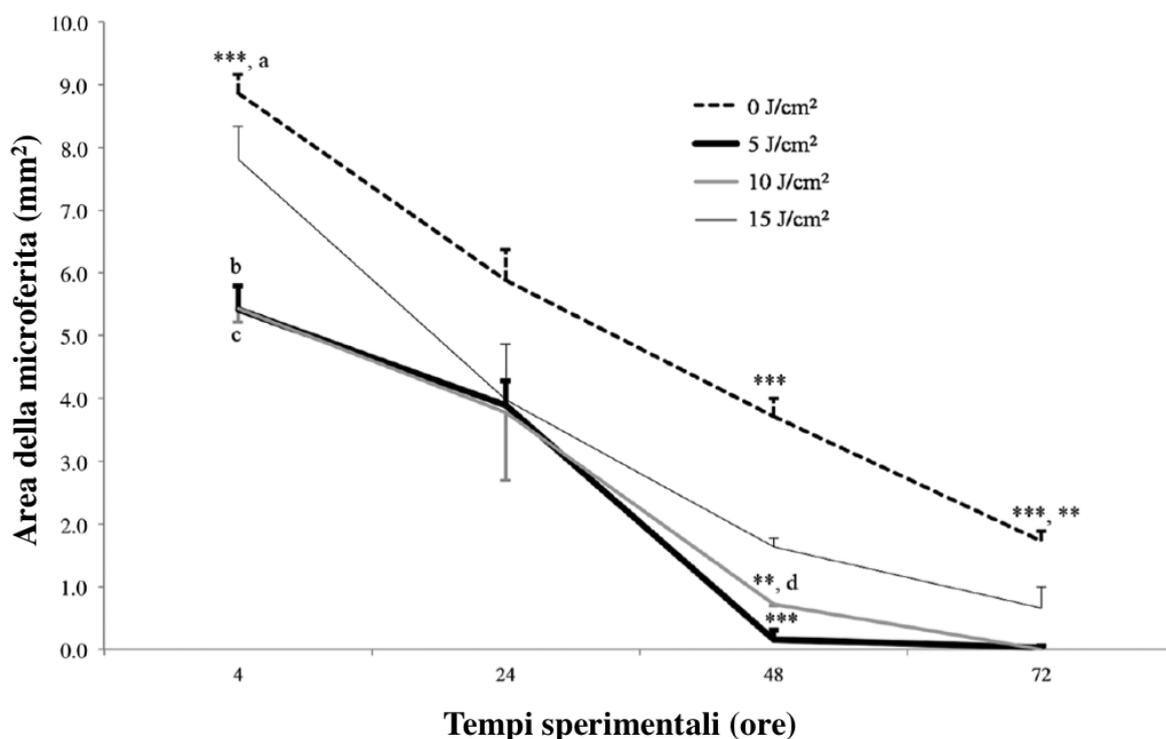


Fig. 2^s Aree misurate a differenti tempi sperimentali (4, 24, 48 e 72 ore) delle microferite di cellule Saos-2 trattate con differenti dosi (5 , 10 e 15 J/cm^2) o non trattate (0 J/cm^2). I dati sono riportati come medie e deviazioni standard. Analisi multivariata della varianza (MANOVA) e test di Tukey come *post-hoc*: 4 h: ***, 0 J/cm^2 versus 5 e 10 J/cm^2 , $p < 0.0005$; 48 h: ***, 0 J/cm^2 versus 5, 10, and 15 J/cm^2 , $p < 0.0005$, ***, 5 J/cm^2 versus 15 J/cm^2 , $p < 0.0005$, **, 10 J/cm^2 versus 15 J/cm^2 , $p = 0.001$; 72 h: ***, 0 J/cm^2 versus 5 e 10 J/cm^2 , $p < 0.0005$, **, 0 J/cm^2 versus 15 J/cm^2 , $p = 0.001$. ANOVA

per misure ripetute e test *post-hoc* con correzione di Bonferroni: 0 J/cm²: a, 4 ore *versus* 24 e 72 ore, p=0.008; 5 J/cm²: b, 4 ore *versus* 72 ore, p=0.008; 10 J/cm²: c, 4 ore *versus* 48 e 72 ore, p=0.003, d, 48 ore *versus* 72 ore, p=0.002.

In maniera simile alle altre colture cellulari, in presenza di MMC, il gruppo irradiato con la dose di 10 J/cm² ha raggiunto la completa chiusura della ferita dopo 72 ore, il gruppo irradiato con la dose di 15 J/cm² è guarito dopo 96 ore, mentre i controlli non irradiati mostravano ancora una guarigione parziale dopo 96 ore (Fig. 3). Il gruppo irradiato con la dose di 5 J/cm² ha raggiunto una chiusura completa della ferita dopo 96 ore (con MMC), invece che dopo 72 ore (senza MMC). Le differenze statisticamente significative tra i gruppi erano leggermente meno pronunciate e più ritardate in presenza di MMC. I gruppi irradiati con le dosi di 10 e 15 J/cm² mostravano una riduzione statisticamente significativa dell'area della microferita rispetto ai controlli non irradiati dopo 24 ore (p=0.003 e p=0.004 rispettivamente) e dopo 72 ore (p=0.001) (Fig. 3). L'analisi dei dati tra i tempi sperimentali ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa dell'area della ferita solo per il gruppo irradiato con la dose di 5 J/cm² tra le 4 e le 48 ore (p=0.001, Fig. 3).

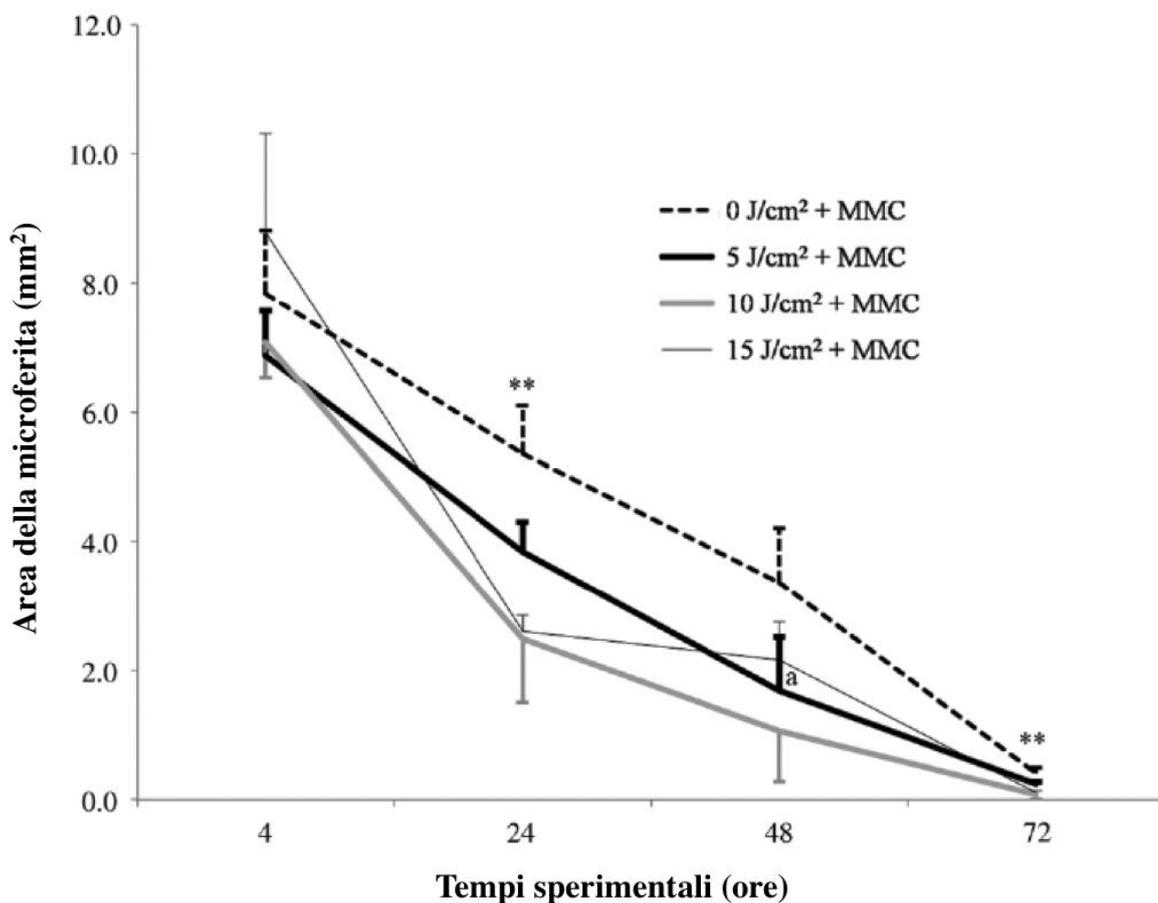


Fig. 3^s Aree misurate a differenti tempi sperimentali (4, 24, 48 e 72 ore) delle microferite di cellule Saos-2 trattate con differenti dosi (5, 10 e 15 J/cm²) o non trattate (0 J/cm²) in presenza di mitomicina C (MMC). I dati sono riportati come medie e deviazioni standard. Analisi multivariata della varianza (MANOVA) e test di Tukey come *post-hoc*: 24 ore: **, 0 J/cm² versus 10 e 15 J/cm², $p < 0.005$; 72 h: **, 0 J/cm² versus 10 e 15 J/cm², $p=0.001$. ANOVA per misure ripetute e test *post-hoc* con correzione di Bonferroni: 5 J/cm²: a, 48 ore versus 4 ore, $p=0.001$.

Vitalità cellulare e quantificazione del DNA

Non vi era differenza statisticamente significativa in termini di vitalità cellulare tra gruppi irradiati e non irradiati per ogni tempo sperimentale (Fig. 4). La vitalità cellulare ha evidenziato un aumento statisticamente significativo tra le 24 e le 72 ore per tutti i gruppi irradiati ($p < 0.0005$ per i

gruppi irradiati con le dosi di 5 e 10 J/cm², p=0.001 per il gruppo irradiato con la dose di 15 J/cm²), tra le 24 e le 48 ore per i gruppi irradiati con le dosi di 5 e 10 J/cm² (p<0.0005) e tra le 48 e le 72 ore per il gruppo irradiato con la dose di 5 J/cm² (p=0.008).

In accordo con i risultati delle analisi sulla vitalità cellulare, non è stata trovata nessuna differenza statisticamente significativa in termini di contenuto di DNA tra i gruppi o i tempi sperimentali.

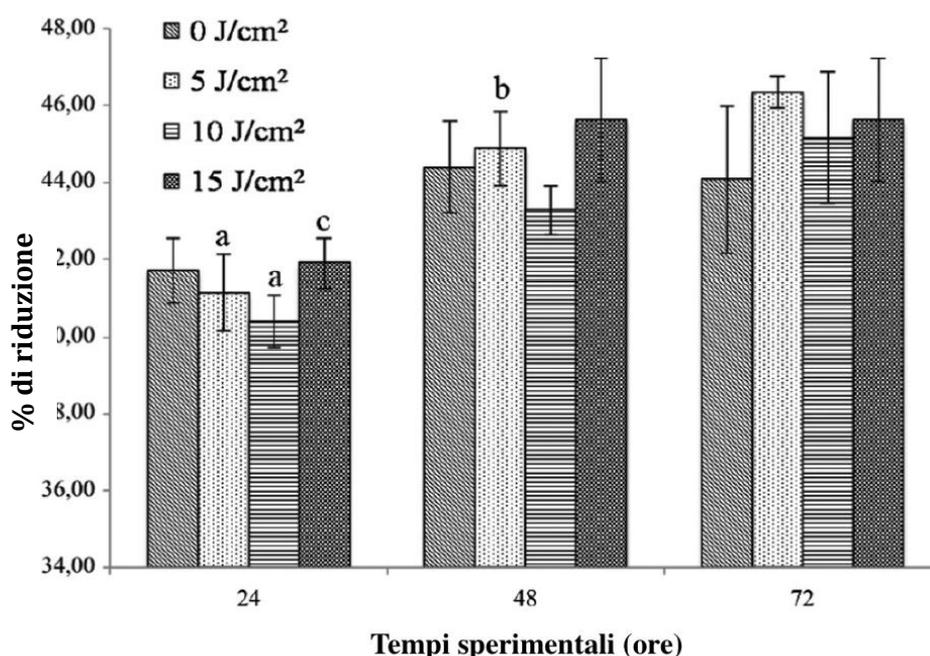


Fig. 4^s Risultati dei saggi di vitalità cellulare sulle cellule Saos-2 trattate con differenti dosi di laser (5, 10 e 15 J/cm²) o non trattate (0 J/cm²) dopo 24, 48 e 72 ore dalla irradiazione. I dati sono presentati come medie e deviazioni standard. ANOVA per misure ripetute e test *post-hoc* con correzione di Bonferroni: 5 e 10 J/cm²: a, 24 ore versus 48 e 72 ore, p<0.0005; 5 J/cm²: b, 48 ore versus 72 ore, p=0.008; 15 J/cm²: c, 24 ore versus 72 ore, p=0.001.

Quantificazione dei livelli di espressione di mRNA tramite PCR

Dopo 24 ore l'espressione genica del COL1A1 era aumentata in tutti i gruppi irradiati rispetto al controllo ($p < 0.0005$, Fig. 5). Inoltre il gruppo irradiato con la dose 15 J/cm^2 ha mostrato un'aumentata espressione genica di COL1A1 rispetto ai gruppi irradiati con le dosi di 5 e 10 J/cm^2 ($p = 0.001$, Fig. 5). Il livello di espressione genica del COL1A1 ha evidenziato un aumento statisticamente significativo a 48 ore nei gruppi 10 e 15 J/cm^2 rispetto al controllo e ha raggiunto i valori più alti nel gruppo 10 J/cm^2 ($p < 0.0005$, Fig. 5). Dopo 72 ore, il gruppo 15 J/cm^2 ha mostrato un aumento nella espressione genica di COL1A1 rispetto al controllo ($p < 0.005$, Fig. 5). Tra i tempi sperimentali, i controlli mostravano un'aumentata espressione genica di COL1A1 a 72 ore rispetto alle 24 ore ($p < 0.0005$, Fig. 5). Il gruppo 10 J/cm^2 mostrava un'aumentata espressione genica di COL1A1 a 48 ore rispetto alle 24 ore ($p < 0.005$, Fig. 5). Lo stesso trend è stato osservato nel gruppo 15 J/cm^2 a 72 ore rispetto alle 48 ore ($p < 0.005$, Fig. 5).

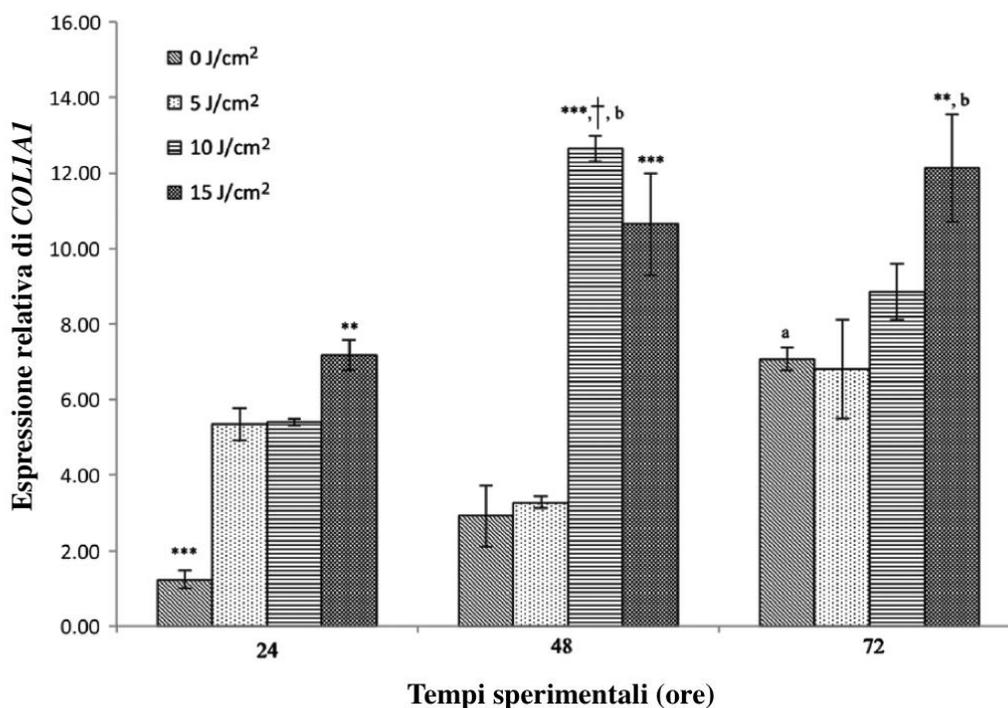


Fig. 5[§] Espressione genica relativa di COL1A1 di cellule Saos-2 trattate con differenti dosi di laser (5, 10 e 15 J/cm²) o non trattate (0 J/cm²) dopo 24, 48 e 72 ore dalla irradiazione. I dati sono riportati come medie e deviazioni standard. Analisi multivariata della varianza (MANOVA) e test di Tukey come *post-hoc*: 24 ore: ***, 0 J/cm² versus 5, 10 e 15 J/cm², $p < 0.0005$; **, 15 J/cm² versus 5 and 10 J/cm², $p = 0.001$. 48 ore: ***, 10 and 15 J/cm² versus 0 J/cm², $p < 0.0005$; †, 10 J/cm² versus 15 J/cm², $p < 0.0005$. 72 ore: **, 15 J/cm² versus 0 J/cm², $p < 0.005$. ANOVA per misure ripetute e test *post-hoc* con correzione di Bonferroni: 0 J/cm²: a, 24 ore versus 72 ore, $p < 0.0005$; 10 J/cm²: b, 24 ore versus 48 ore, $p < 0.005$; 15 J/cm²: b, 48 ore versus 72 ore, $p < 0.005$.

L'espressione genica del TGFbeta1 non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i gruppi dopo 24 ore; dopo 48 ore i controlli mostravano un'augmentata espressione rispetto ai gruppi irradiati con le dosi di 5 J/cm² ($p=0.008$) e 15 J/cm² ($p<0.0005$) (Fig. 6). Dopo 72 ore, il gruppo 10 J/cm² evidenziava una ridotta espressione genica di TGFbeta1 rispetto al controllo ($p<0.0005$) (Fig. 6). Tra i tempi sperimentali, i controlli mostravano un'augmentata espressione genica di TGFbeta1 a 24 ore rispetto

alle 48 ore ($p < 0.0005$, Fig. 6); a 72 ore l'espressione genica del TGFbeta1 nel gruppo 10 J/cm^2 era diminuita rispetto alle 24 ore ($p = 0.001$) (Fig. 6).

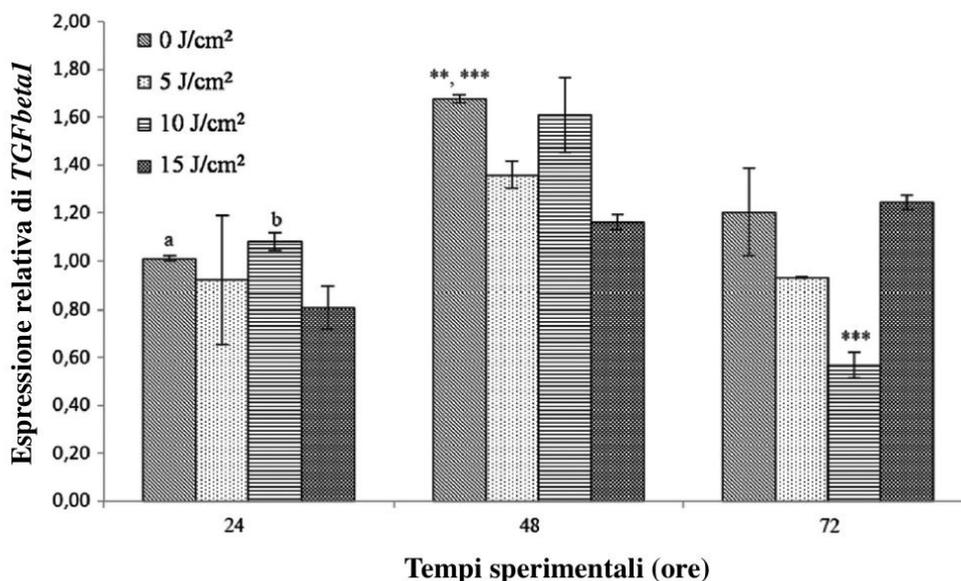


Fig. 6⁸ Espressione genica relativa di TGFbeta1 di cellule Saos-2 trattate con differenti dosi di laser ($5, 10$ e 15 J/cm^2) o non trattate (0 J/cm^2) dopo 24, 48 e 72 ore dalla irradiazione. I dati sono riportati come medie e deviazioni standard. Analisi multivariata della varianza (MANOVA) e test di Tukey come *post-hoc*: 48 ore: **, 0 J/cm^2 versus 5 J/cm^2 , $p = 0.008$; ***, 0 J/cm^2 versus 15 J/cm^2 , $p < 0.0005$. 72 ore: ***, 10 J/cm^2 versus 0 J/cm^2 , $p < 0.0005$. ANOVA per misure ripetute e test *post-hoc* con correzione di Bonferroni: 0 J/cm^2 : a, 24 ore versus 48 ore, $p < 0.0005$; 10 J/cm^2 : b, 24 ore versus 72 ore, $p = 0.001$.

L'espressione genica di IL1beta e MMP1 non era evidenziabile in nessuna condizione o tempo sperimentale.

Saggi immunoenzimatici

Non è stata osservata nessuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi irradiati e non irradiati in termini di rilascio di COLL1 e TGFbeta1.

A livello proteico, la PGE₂ non era evidenziabile in nessuna condizione o tempo sperimentale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Questo lavoro è il primo a esaminare gli effetti della irradiazione con laser a diodi GaAlAs 915 nm sulla migrazione e proliferazione di osteoblasti usando un modello di microferita *in vitro*. Questo metodo di microferita è stato già descritto come un modo conveniente ed economico per misurare la capacità di guarigione *in vitro* delle cellule.² Inoltre, il trattamento con MMC ci ha consentito di indagare il contributo relativo della migrazione e della proliferazione cellulare sul processo di chiusura della microferita. Una linea di cellule umane Saos-2 derivate da osteosarcoma è stata utilizzata data la somiglianza con il fenotipo degli osteoblasti umani maturi e il ruolo chiave nel processo di guarigione e rimodellamento del tessuto osseo.^{3,4} A differenza di altre linee di cellule umane derivate da osteosarcoma, come le cellule U2OS usate da Spitler e Berns,⁵ la linea cellulare usata per questo studio è in grado di differenziare e formare matrice calcificata e assomiglia maggiormente al profilo degli osteoblasti in termini di espressione di proteine legate al rimodellamento osseo.⁶ In questo studio è stato impiegato un laser a diodi perché è uno dei più comunemente utilizzati nella pratica clinica e la lunghezza d'onda di 915 nm consente una maggiore penetrazione in profondità, fatto che risulta essere vantaggioso per le applicazioni cliniche sull'osso.^{1,7}

Le cellule irradiate con una singola applicazione di laser con le dosi di 5, 10 e 15 J/cm² hanno mostrato un'aumentata capacità di guarigione rispetto ai controlli non irradiati. Tali controlli presentavano ancora una guarigione parziale dopo 96 ore, mentre le cellule irradiate con dosi di 5 e 10 J/cm² sono state le prime a raggiungere la guarigione completa dopo 72 ore. Il

gruppo irradiato con la dose di 15 J/cm^2 ha ottenuto una completa chiusura della ferita dopo 96 ore e ha mostrato una tendenza ad una aumentata area della ferita rispetto agli altri gruppi irradiati ad ogni tempo sperimentale, suggerendo una ridotta capacità di guarigione per questa dose di irradiazione. Quando la MMC è stata aggiunta al terreno di coltura, abolendo così il contributo della proliferazione cellulare, solo il gruppo irradiato con la dose 5 J/cm^2 ha raggiunto la completa guarigione in maniera ritardata (dopo 96 invece che dopo 72 ore). Conformemente a ciò, in presenza di MMC, il gruppo 5 J/cm^2 non mostrava una riduzione statisticamente significativa dell'area della microferita mentre i gruppi 10 e 15 J/cm^2 mantenevano una riduzione di tale area rispetto ai controlli non irradiati. Questi dati suggeriscono che l'irradiazione con laser a lunghezza d'onda 915 nm favorisce la chiusura dell'area della microferita principalmente attraverso la stimolazione della migrazione delle cellule Saos-2, in accordo con uno studio precedente condotto su cellule umane derivate da osteosarcoma usando laser con lunghezze d'onda di 652 e 806 nm .⁵ Studi precedenti hanno dimostrato la capacità del laser a bassa dose di stimolare la proliferazione e la migrazione di molti altri fenotipi cellulari, ma il paragone diretto con i nostri dati non è appropriato a causa delle differenti condizioni *in vitro*.⁸⁻¹¹

È stato osservato un aumento statisticamente significativo della vitalità cellulare tra i tempi sperimentali nei gruppi irradiati, ma non in quelli non irradiati. Tuttavia, non è stata rilevata nessuna differenza statisticamente significativa tra i gruppi irradiati e non irradiati. Un lavoro precedente condotto su cellule Saos-2 sane con lo stesso dispositivo e gli stessi parametri laser usati nel presente studio aveva concluso che, a 72 ore dalla irradiazione, il gruppo irradiato con la dose di 10 J/cm^2 mostrava una vitalità cellulare significativamente aumentata rispetto al controllo.¹²

Probabilmente, questi risultati contraddittori possono essere ascritti ai differenti modelli *in vitro* adottati.

In accordo coi risultati in termini di vitalità cellulare, l'irradiazione laser non ha avuto nessun effetto statisticamente significativo sul contenuto di DNA. D'altra parte, il laser ha mostrato una influenza sulle proprietà anaboliche cellulari attraverso la modulazione dell'espressione genica di COL1A1 e TGFbeta1. COL1A1 è tra le principali proteine nella matrice extracellulare del tessuto osseo ed è intimamente correlata al raggiungimento della guarigione tissutale ossea. Le cellule non irradiate hanno mostrato livelli in costante aumento nel tempo in termini di espressione genica di COL1A1; l'irradiazione laser ha aumentato in maniera significativa la sua espressione genica, raggiungendo differenze statisticamente significative per i gruppi 5, 10 e 15 J/cm² dopo 24 ore, per i gruppi 10 e 15 J/cm² dopo 48 ore e per il gruppo 15 J/cm² dopo 72 ore rispetto ai controlli. Questi dati suggeriscono che, nel range compreso tra 5 e 15 J/cm², dosi maggiori inducano un effetto più durevole nel tempo sull'espressione genica di COL1A1. Questo trend è stato confermato anche dall'analisi delle proteine, sebbene non siano state trovate differenze statisticamente significative. Nonostante i diversi dispositivi e parametri laser utilizzati, i nostri risultati sono in linea con quelli ottenuti da altri studi, che hanno trovato un'aumentata espressione per questo gene dopo irradiazione laser su fibroblasti di topo,¹³ fibroblasti gengivali umani,¹⁴ tessuto osseo di ratto,¹⁵ cheratinociti umani¹¹ e fibroblasti derivati da tendine di Achille di maiali.¹⁶

Un effetto leggermente più ritardato dell'irradiazione laser è stato trovato sulla espressione genica del TGFbeta1, una potente citochina che agisce come fattore determinante nel processo di guarigione del tessuto osseo. Rispetto ai controlli non irradiati, i gruppi irradiati con le dosi 5 e 15 J/cm²

hanno mostrato una ridotta espressione genica di TGFbeta1 a 48 ore, mentre solo il gruppo 10 J/cm² ha mantenuto livelli di espressione genica paragonabili o significativamente ridotti. Studi precedenti hanno mostrato un' aumentata produzione di TGFbeta1 dopo irradiazione con laser a bassa dose su cellule osteoblastiche, ma senza utilizzare il modello di microferita *in vitro*.¹⁷ Altri lavori hanno supportato l'idea che la sua secrezione diminuisse dopo irradiazione con laser e LED sia *in vivo* su ratti che *in vitro* su cellule endoteliali umane di vena ombelicale.^{18,19} Inoltre, i livelli di TGFbeta1 hanno mostrato di seguire un pattern di espressione fasica in uno studio clinico sulla guarigione dei siti post-estrattivi.²⁰ Tuttavia, questi effetti biologici sembravano dipendere dal fenotipo cellulare e anche dai parametri di irradiazione, principalmente lunghezza d'onda, densità energetica e tempo di irradiazione.^{1,18,19} Pertanto, il paragone diretto con il nostro studio non è appropriato a causa dei diversi dispositivi laser, protocolli di trattamento, modelli *in vitro* e condizioni sperimentali. Nella nostra sperimentazione, nei tempi sperimentali precoci, solo il gruppo irradiato con 10 J/cm² manteneva un'espressione genica di TGFbeta1 simile a quella dei controlli, mentre i gruppi 5 e 15 J/cm² mostravano una ridotta espressione genica suggerendo una risposta bifasica delle cellule osteoblastiche irradiate con laser.¹⁰

Questo studio ha quindi esaminato gli effetti di una irradiazione singola di laser sulla guarigione di una microferita; la potenza, la frequenza e l'area trattata sono state mantenute costanti, mentre è stata variata solo la dose come principale variabile oggetto di studio in quanto essa è stata riconosciuta come il più importante parametro laser responsabile della risposta biologica.²¹ Ulteriori studi con applicazioni multiple di laser potrebbero rendere più evidente la risposta cellulare grazie ad un effetto cumulativo del laser.²² I nostri risultati indicano che il modello di microferita *in vitro* ha indotto un danno meccanico senza alterare lo stato

infiammatorio, data la mancanza di espressione genica di proteine infiammatorie e cataboliche come IL1beta e MMP1 e la mancanza di produzione di PGE₂. Per ulteriori studi potrebbe essere utile utilizzare cellule umane primarie patologiche e aggiungere citochine infiammatorie al terreno di coltura al fine di ricreare un ambiente *in vitro* più simile a quello della guarigione delle ferite *in vivo*. Rigorosi studi *in vitro* sui meccanismi cellulari e fotobiologici dell'irradiazione laser potranno aiutare a colmare il vuoto tra la ricerca *in vitro* e le applicazioni biomediche.

I risultati ottenuti in questo studio sono stati oggetto della seguente pubblicazione scientifica:

Tschon M, Incerti Parenti S, Cepollaro S, Checchi L, Fini M. Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. J Biomed Opt 2015;20(7):78002.

§ Tutte le figure e le tabelle presenti in questo capitolo sono state tratte dall'articolo: Tschon M, Incerti Parenti S, Cepollaro S, Checchi L, Fini M. Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. J Biomed Opt 2015;20(7):78002.

Bibliografia

1. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med Sci* 2012;27:237-49.
2. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329-33.
3. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:2636-43.
4. Griffin M, Iqbal SA, Sebastian A, Colthurst J, Bayat A. Degenerate wave and capacitive coupling increase human MSC invasion and proliferation while reducing cytotoxicity in an in vitro wound healing model. *PLoS One* 2011;6:e23404.
5. Spitler R, Berns MW. Comparison of laser and diode sources for acceleration of in vitro wound healing by low-level light therapy. *J Biomed Opt* 2014;19:38001.
6. Burmester A, Luthringer B, Willumeit R, Feyerabend F. Comparison of the reaction of bone-derived cells to enhanced MgCl₂-salt concentrations. *Biomater* 2014;4:e967616.
7. Huertas RM, Luna-Bertos ED, Ramos-Torrecillas J, Leyva FM, Ruiz C, García-Martínez O. Effect and clinical implications of the low-energy diode laser on bone cell proliferation. *Biol Res Nurs* 2014;16:191-6.
8. Ejiri K, Aoki A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Izumi Y. High-frequency low-level diode laser irradiation promotes proliferation and migration of primary cultured human gingival epithelial cells. *Lasers Med Sci* 2014;29:1339-47.

9. Liao X, Xie GH, Liu HW, Cheng B, Li SH, Xie S, Xiao LL, Fu XB. Helium-neon laser irradiation promotes the proliferation and migration of human epidermal stem cells in vitro: proposed mechanism for enhanced wound re-epithelialization. *Photomed Laser Surg* 2014;32:219-25.
10. Tsai WC, Hsu CC, Pang JH, Lin MS, Chen YH, Liang FC. Low-level laser irradiation stimulates tenocyte migration with up-regulation of dynamin II expression. *PLoS One* 2012;7:e38235.
11. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci* 2013;28:367-74.
12. Incerti Parenti S, Checchi L, Fini M, Tschon M. Different doses of low-level laser irradiation modulate the in vitro response of osteoblast-like cells. *J Biomed Opt* 2014;19:108002.
13. Martignago CC, Oliveira RF, Pires-Oliveira DA, Oliveira PD, Pacheco Soares C, Monzani PS, Poli-Frederico RC. Effect of low-level laser therapy on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Lasers Med Sci* 2015;30:203-8.
14. Frozanfar A, Ramezani M, Rahpeyma A, Khajehahmadi S, Arbab HR. The Effects of Low Level Laser Therapy on the Expression of Collagen Type I Gene and Proliferation of Human Gingival Fibroblasts (Hgf3-Pi 53): in vitro Study. *Iran J Basic Med Sci* 2013;16:1071-4.
15. Park JB, Ahn SJ, Kang YG, Kim EC, Heo JS, Kang KL. Effects of increased low-level diode laser irradiation time on extraction socket healing in rats. *Lasers Med Sci* 2015;30:719-26.
16. Chen CH, Tsai JL, Wang YH, Lee CL, Chen JK, Huang MH. Low-level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of

- type I collagen and decorin in porcine Achilles tendon fibroblasts in vitro. *J Orthop Res* 2009;27:646-50.
17. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 2005;26:3503-9.
18. de Sousa AP, de Aguiar Valença Neto Ade A, Marchionni AM, de Araújo Ramos M, dos Reis Júnior JA, Pereira MC, Cangussú MC, de Almeida Reis SR, Pinheiro AL. Effect of LED phototherapy ($\lambda 700 \pm 20$ nm) on TGF- β expression during wound healing: an immunohistochemical study in a rodent model. *Photomed Laser Surg* 2011;29:605-11.
19. Szymanska J, Goralczyk K, Klawe JJ, Lukowicz M, Michalska M, Goralczyk B, Zalewski P, Newton JL, Gryko L, Zajac A, Rosc D. Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:387-91.
20. Arany PR, Nayak RS, Hallikerimath S, Limaye AM, Kale AD, Kondaiah P. Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser-enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen* 2007;15:866-74.
21. Tuner J and Hode L, *The Laser Therapy Handbook*, 4th ed., Prima Books AB, Grangesberg, Sweden (2004).
22. Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res* 2001;4:3-14.

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento al mio Tutor, Prof. Luigi Checchi, per avermi guidata e stimolata durante questo interessante percorso.

Un ringraziamento speciale alla Prof.ssa Milena Fini e alla Dott.ssa Matilde Tschon per avermi costantemente aiutata e seguita durante tutte le fasi del mio lavoro di ricerca e per avermi accolta in un ambiente ricco di stimoli e di conoscenze utili per la mia formazione.