



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA E MEDICINA INTERDISCIPLINARE

Dottorato di Ricerca in Parodontologia Sperimentale

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO
EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO
CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

Coordinatore: Prof. Marco Giovanni Baldoni

Tutore: Dott. Gianluigi Caccianiga

Tesi di Dottorato:

Dott. Aimone Cambini

Matricola 064491

Ciclo XXV – ANNO ACCADEMICO 2011/2012

*“Sognate e mirate sempre più in alto di quello che ritenete alla vostra portata.
Non cercate solo di superare i vostri contemporanei o i vostri predecessori.
Cercate, piuttosto, di superare voi stessi.”*

W. Faulkner

SOMMARIO

1. REVIEW DELLA LETTERATURA.....	6
1.1 CENNI DI ANATOMIA DEL TESSUTO GENGIVALE	6
1.1.1 Anatomia macroscopica	6
1.1.2 Anatomia microscopica.....	8
1.1.3 Epitelio dentogengivale.....	13
1.2 L'IMPORTANZA DEL TESSUTO CHERATINIZZATO PER LA SALUTE ORALE	19
1.2.1 Gengiva aderente: considerazioni anatomiche	19
1.2.2 Dimensione gengivale e salute parodontale	21
1.2.3 Salute parodontale e terapie pedo-ortodontiche	24
1.2.4 Banda gengivale e salute implantare	28
1.3. TECNICHE DI AUMENTO GENGIVALE.....	31
1.3.1 Indicazioni	31
1.3.2 Tecniche di estensione vestibolare/gengivale	32
1.3.3 Tecniche di innesto.....	33
1.3.4 Guarigione dopo tecniche di estensione	35
1.3.4 Guarigione dopo tecniche di innesto	37
1.4. LOW-LEVEL LASER THERAPY.....	39
1.4.1 Laser e medicina.....	39
1.4.2 Meccanismi molecolari della proliferazione cellulare indotta dalla LLLT	40
1.4.3 Segnali cellulari in seguito a LLLT.....	42
1.4.4 Meccanismi di azione ed effetti biologici della LLLT.....	43
1.4.5 Applicazione della LLLT su colture cellulari	47
1.5 RIPRODUZIONE IN VITRO DEL TESSUTO EPITELIALE	52

1.5.1 Co-culture di mucosa orale.....	54
1.5.2 Espressione della cheratina nei tessuti epiteliali	55
2. FASE SPERIMENTALE	59
2.1 SCOPO DELLA RICERCA.....	59
2.2 MATERIALI E METODI.....	60
2.2.1 Preparazione delle colture cellulari	60
2.2.2 Allestimento dei campioni sperimentali.....	69
2.2.3 Irradiazione.....	70
2.2.4 Raccolta dati	72
2.3 RISULTATI	72
2.4 DISCUSSIONE	78
2.5 CONCLUSIONI.....	84
2.6 PROSPETTIVE FUTURE	85
3. BIBLIOGRAFIA.....	86
Ringraziamenti	96

1. REVIEW DELLA LETTERATURA

1.1 CENNI DI ANATOMIA DEL TESSUTO

GENGIVALE

1.1.1 Anatomia macroscopica

La mucosa orale (membrana mucosa) non ha soluzioni di continuità con la cute delle labbra e con le mucose del palato molle e della faringe. E' costituita dalla mucosa masticatoria, comprendente la gengiva e il rivestimento del palato duro, dalla mucosa specializzata, che copre il dorso della lingua e dalla parte di mucosa restante, chiamata mucosa di rivestimento. La gengiva è quella parte di mucosa masticatoria che ricopre il processo alveolare e circonda il colletto dei denti. E' costituita da uno strato epiteliale e da uno strato sottostante di tessuto connettivo, chiamato lamina propria. La gengiva raggiunge la sua forma e la sua organizzazione definitive in concomitanza con l'eruzione dei denti. In direzione della corona, la gengiva appare di colore rosa corallo e termina con il margine gengivale libero, che ha un contorno festonato. In direzione dell'apice, la gengiva continua con la mucosa alveolare (mucosa di rivestimento), che appare per mezzo di una linea di confine generalmente ben riconoscibile, chiamata giunzione mucogengivale o linea mucogengivale. Nel palato non è presente una linea mucogengivale perchè il palato duro e il processo alveolare mascellare sono ricoperti dallo stesso tipo di mucosa masticatoria. La gengiva può essere differenziata in due parti; la gengiva libera e la gengiva aderente. La gengiva libera è di colore rosa corallo, ha superficie opaca e consistenza compatta. Di essa fanno

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

parte il tessuto gengivale presente sulle superfici vestibolare e linguale o palatale dei denti e la gengiva interdentale che forma le papille interdentali. Sulle facce vestibolare e linguale dei denti, la gengiva libera si estende dal margine gengivale in direzione dell'apice fino al solco gengivale libero, che è situato allo stesso livello della giunzione smalto-cemento (CEJ). La gengiva aderente è delimitata in direzione apicale dalla giunzione mucogengivale (MGJ). il margine gengivale libero è spesso arrotondato in modo tale che fra dente e gengiva viene a formarsi una piccola invaginazione o solco. Quando una sonda parodontale è inserita in questa invaginazione e spinta in direzione apicale verso la giunzione smalto-cemento, il tessuto gengivale viene separato dal dente e si apre artificialmente una tasca gengivale o fessura gengivale. Quindi, nella gengiva normale o clinicamente sana non sono presenti in realtà nè la tasca gengivale nè la fessura gengivale, ma la gengiva è a stretto contatto con la superficie dello smalto. Dopo la completa eruzione del dente, il margine gengivale libero è localizzato sulla superficie dello smalto in direzione coronale, a circa 1,5-2 mm dalla giunzione smalto-cemento. La forma della gengiva interdentale (o papilla interdentale) è determinata dai rapporti di contatto fra i denti, dall'ampiezza delle loro superfici approssimali e dal decorso della giunzione smalto-cemento. Nelle regioni anteriori le papille interdentali hanno forma piramidale, mentre nelle regioni dei denti molari sono più appiattite in direzione buccolinguale. Per presenza delle papille interdentali, il margine gengivale libero decorre sulla dentatura con un andamento festonato più o meno accentuato. Nelle regioni premolari e molari delle arcate dentali, i denti hanno superfici approssimali di contatto, più che punti di contatto. Poichè la papilla interdentale ha una forma che dipende dal contorno delle superfici di contatto tra i denti, nelle regioni premolari e molari si viene a formare una concavità (colle). In queste aree la porzione vestibolare e quella linguale o palatale delle papille interdentali sono spesso separate dalla regione del colle che, come mostrato nella

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

sezione istologica, è rivestita da un sottile epitelio non cheratinizzato che ha molte caratteristiche in comune con l'epitelio giunzionale. La gengiva aderente è delimitata in direzione coronale dal solco gengivale libero o, quando questo non è presente, da un piano orizzontale posto a livello della giunzione smalto-cemento. All'esame clinico è stato osservato che il solco gengivale libero è presente soltanto nel 30-40% circa degli adulti. Spesso è più pronunciato sulla superficie vestibolare dei denti e si riscontra con maggiore frequenza nelle regioni dei denti incisivi e premolari inferiori e con minore frequenza nelle regioni dei denti molari inferiori e premolari superiori. La gengiva aderente si estende in direzione apicale fino alla giunzione mucogengivale dove continua con la mucosa alveolare di rivestimento. Ha consistenza compatta e colore rosa corallo, mostrando spesso piccole depressioni superficiali che, rendendo la superficie punteggiata, le conferiscono un aspetto a "buccia d'arancia". La gengiva aderente è saldamente fissata all'osso alveolare e al cemento sottostanti per mezzo di fibre connettivali che la rendono praticamente immobile rispetto al tessuto sottostante. La mucosa alveolare, di colore rosso più scuro, situata in sede apicale rispetto alla giunzione mucogengivale, è invece scarsamente aderente all'osso sottostante. Quindi, al contrario della gengiva aderente, la mucosa alveolare risulta mobile nei confronti del tessuto sottostante.

1.1.2 Anatomia microscopica

La gengiva libera comprende tutte le strutture tessutali epiteliali e connettivali situate coronalmente a una linea orizzontale che passa a livello della giunzione smalto-cemento. L'epitelio che riveste la gengiva libera può essere differenziato come segue: epitelio orale, prospiciente la cavità orale; epitelio orale sulcolare rivolto verso il dente ma non in contatto con la sua superficie; epitelio giunzionale,

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

attraverso cui si realizza il contatto fra gengiva e dente. Il confine fra l'epitelio orale e il sottostante tessuto connettivo ha un decorso ondulato. Le porzioni di tessuto connettivo che si proiettano nell'epitelio sono dette papille connettivali e sono separate le una dalle altre da creste epiteliali dette digitazioni epiteliali. Nella gengiva normale, non infiammata, le digitazioni epiteliali e le papille connettivali mancano nella zona di confine fra epitelio giunzionale e tessuto connettivo sottostante. Quindi una caratteristica morfologica dell'epitelio orale e di quello sulcolare orale è la presenza di digitazioni epiteliali, che sono invece assenti nell'epitelio giunzionale. La superficie interna dell'epitelio orale (cioè la superficie epiteliale che guarda verso il tessuto connettivo) mostra parecchie depressioni che corrispondono alle papille connettivali che si proiettano all'interno dell'epitelio. Si può vedere come le proiezioni epiteliali, che nelle sezioni istologiche separano le papille connettivali, costituiscano un sistema continuo di creste epiteliali. Nel 40% della popolazione adulta la gengiva aderente mostra una superficie a "buccia d'arancia". L'immagine illustra un caso in cui questo aspetto risulta particolarmente evidente. Nell'immagine è presentato un modello ingrandito della superficie esterna dell'epitelio orale della gengiva aderente. La superficie mostra minuscole depressioni che, quando presenti, conferiscono alla gengiva il caratteristico aspetto a buccia d'arancia. La superficie interna dell'epitelio è caratterizzata dalla presenza di creste epiteliali che si uniscono in vari punti. Le depressioni viste sulla superficie esterna dell'epitelio corrispondono ai punti di fusione fra le creste epiteliali. Quindi le depressioni sulla superficie della gengiva si formano in corrispondenza delle aree di unione fra le varie creste epiteliali.

L'epitelio orale, squamoso, stratificato, cheratinizzato, può essere diviso, sulla base del grado di differenziazione delle cellule che producono cheratina, nei seguenti strati cellulari: strato basale (stratum basale o stratum germinativum); strato delle cellule spinose (stratum spinosum); strato delle cellule granulari (stratum

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

granulosum); strato delle cellule cheratinizzate (stratum corneum). Quando i nuclei cellulari sono assenti negli strati più esterni, il tipo di epitelio è denominato ortocheratinizzato. Spesso, però, le cellule dello strato corneo dell'epitelio della gengiva umana contengono residui dei nuclei; in tal caso l'epitelio è denominato paracheratinizzato. Le cellule dello strato basale hanno forma cilindrica o cuboide e sono in contatto con la membrana basale che separa l'epitelio dal tessuto connettivo. Le cellule basali sono in grado di dividersi, vanno cioè incontro a divisione mitotica. E' nello strato basale che l'epitelio si rinnova; questo strato è perciò anche chiamato stratum germinativum e può essere considerato il compartimento delle cellule progenitrici dell'epitelio. Quando due cellule figlie si sono formate dalla divisione cellulare, una "vecchia" cellula basale adiacente è spinta all'interno dello strato di cellule spinose e comincia, come cheratinocito, ad attraversare l'epitelio. Questa cellula impiega circa un mese per raggiungere la superficie esterna dell'epitelio, dove ha inizio la sua desquamazione dallo strato corneo. In un dato periodo di tempo il numero di cellule che si dividono nello strato basale eguaglia il numero di cellule desquamate dalla superficie. In condizioni normali si ha così un completo equilibrio fra le cellule rinnovate e quelle desquamate, che mantiene costante lo spessore dell'epitelio. Man mano che la cellula basale migra attraverso l'epitelio tende ad appiattirsi, divenendo il suo asse lungo parallelo alla superficie epiteliale. Le cellule basali si trovano nelle immediatamente adiacenze del tessuto connettivo e sono separate da questo tessuto attraverso una membrana basale, prodotta probabilmente dalle cellule basali. Al microscopio ottico questa membrana appare come una zona non strutturata, ampia circa 1-2 μm , che reagisce positivamente alla colorazione PAS. La positività di questa reazione dimostra che la membrana basale contiene carboidrati (glicoproteine). Le cellule epiteliali sono circondate da una sostanza extracellulare contenente anch'essa complessi di proteine-polisaccaridi. A livello ultrastrutturale

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

la membrana basale mostra una colorazione complessa. Immediatamente al di sotto della cellula basale si nota una zona elettrone-trasparente, larga circa 40 nm, denominata lamina lucida. Sotto la lamina lucida si nota una zona elettrone-densa che ha circa lo stesso spessore precedente. Questa zona è chiamata lamina densa. Dalla lamina densa si proiettano a ventaglio, nel contesto del tessuto connettivo, le cosiddette fibre di ancoraggio. Queste sono lunghe circa 1 μm e terminano liberamente nel tessuto connettivo. La membrana basale, che al microscopio ottico appare come un'entità unica, risulta invece composta, al microscopio elettronico, da una lamina lucida e da una lamina densa con adiacenti fibre connettivali (fibre di ancoraggio). La membrana cellulare delle cellule epiteliali a contatto con la lamina lucida presenta una serie di zone elettrone-dense, più spesse, poste a intervalli variabili lungo la membrana cellulare. Queste strutture sono dette emidesmosomi. I tonofilamenti citoplasmatici che si trovano all'interno della cellula convergono verso questi emidesmosomi, che risultano coinvolti nell'attacco dell'epitelio alla sottostante membrana basale. Lo strato spinoso è formato da 10-20 strati di cellule relativamente larghe, poliedriche, fornite di corti processi citoplasmatici sono disposti a intervalli regolari e conferiscono alle cellule il caratteristico aspetto spinoso. In aggiunta ai complessi intercellulari costituiti da proteine e carboidrati, la coesione tra le cellule è assicurata da numerosi desmosomi (coppie di emidesmosomi) che sono localizzati fra i processi citoplasmatici delle cellule adiacenti. La presenza di un gran numero di desmosomi indica una solida coesione fra le cellule epiteliali. Nell'attraversamento dell'epitelio dallo strato basale alla superficie, i cheratinociti vanno incontro ad un processo continuo di differenziazione e specializzazione. Passando dallo strato basale a quello granuloso si ha un aumento sia del numero di tonofilamenti contenuti nel citoplasma sia del numero di desmosomi. Al contrario, organuli come i mitocondri, le lamelle del reticolo endoplasmatico rugoso, i complessi di

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

Golgi diminuiscono nei cheratinociti man mano che dallo strato basale ci si avvicina alla superficie epiteliale. Nello strato granuloso cominciano ad apparire corpuscoli cheratoialini elettron-densi e raggruppamenti di granuli contenenti glicogeno. Si ritiene che tali granuli siano correlati alla sintesi di cheratina. Con il passaggio dallo strato granuloso a quello corneo si ha un brusco cambiamento delle cellule, indicativo di una cheratinizzazione improvvisa del citoplasma dei cheratinociti e della loro trasformazione in una squama cornea. Nello strato corneo il citoplasma delle cellule è pieno di cheratina e l'intero apparato per la sintesi proteica e la produzione di energia, cioè il nucleo, i mitocondri, il reticolo endoplasmatico ed il complesso di Golgi, è andato perduto. Negli epitelii paracheratinizzati, invece, le cellule dello strato corneo contengono residui dei nuclei. La cheratinizzazione è considerata più un processo di differenziazione che di degenerazione, trattandosi di un processo di sintesi proteica che richiede energia e che dipende da cellule funzionali, cioè da cellule che contengono un nucleo e un normale corredo di organuli. I cheratinociti sono sottoposti ad un processo di continua differenziazione nel loro passaggio dallo strato basale alla superficie dell'epitelio. Quindi, una volta che il cheratinocito ha lasciato la membrana basale, non può più dividersi, ma mantiene la capacità di produrre proteine (tonofilamenti e granuli di cheratoialina). Nello strato granuloso il cheratinocito non presenta più l'apparato per la sintesi delle proteine e la produzione di energia (probabilmente per una demolizione degli enzimi) e si trasforma improvvisamente in una cellula piena di cheratina che si desquama dallo strato corneo distaccandosi dalla superficie dell'epitelio.

1.1.3 Epitelio dentogengivale

I componenti tessutali della regione dentogengivale raggiungono le loro caratteristiche strutturali definitive in concomitanza con l'eruzione dei denti. Quando lo smalto del dente è completamente formato, comincia a ridursi l'altezza delle cellule produttrici dello smalto (ameloblasti), che producono una lamina basale e formano, insieme con le cellule provenienti dall'epitelio esterno dello smalto, il cosiddetto epitelio dentale ridotto. La lamina basale giace a diretto contatto con lo smalto e il contatto fra questa lamina e le cellule epiteliali è mantenuto da emidesmosomi. L'epitelio ridotto dello smalto circonda la corona del dente a partire dal momento in cui lo smalto è adeguatamente mineralizzato fino a quando ha inizio l'eruzione dei denti. Appena il dente in fase di eruzione si avvicina all'epitelio orale, si osserva un aumento dell'attività mitotica delle cellule dello strato esterno dell'epitelio dentale ridotto, ma anche di quelle dello strato basale dell'epitelio orale, che iniziano a migrare nel tessuto connettivo sottostante. L'epitelio in fase di migrazione forma una massa epiteliale tra l'epitelio orale e quello dentale ridotto, in modo che l'eruzione del dente possa avvenire senza emorragia. Gli ameloblasti primitivi non si dividono. Quando il dente si presenta nella cavità orale, ampie porzioni di smalto localizzate in direzione apicale subito dopo l'area incisale vengono rivestite da epitelio giunzionale che contiene soltanto pochi strati cellulari. La regione cervicale dello smalto è però ancora rivestita da ameloblasti e da cellule esterne dell'epitelio dentale ridotto. Durante le fasi successive dell'eruzione del dente tutte le cellule dell'epitelio ridotto dello smalto sono sostituite da un epitelio giunzionale. Questo epitelio è in continuità con l'epitelio orale e fornisce l'attacco fra dente e gengiva. Se dopo l'eruzione completa del dente si asporta la gengiva libera, si svilupperà in fase di guarigione un nuovo epitelio giunzionale non distinguibile da quello che si riscontra dopo l'eruzione del

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

dente. Il fatto che questo nuovo epitelio giunzionale si sia sviluppato dall'epitelio orale indica che le cellule di questo epitelio hanno la capacità di differenziarsi in cellule dell'epitelio giunzionale. L'epitelio sulcolare orale copre il solco gengivale, poco profondo, localizzato tra lo smalto e il margine della gengiva libera. L'epitelio giunzionale differisce morfologicamente dall'epitelio sulcolare orale e dall'epitelio orale, che sono invece strutturalmente molto simili. Pur con variazioni a livello individuale, l'epitelio giunzionale è più ampio nella sua porzione coronale (circa 15-20 strati cellulari), mentre diventa più sottile (3-4 strati) verso la giunzione smalto-cemento. La linea di confine tra l'epitelio giunzionale e il tessuto connettivo sottostante non presenta digitazioni epiteliali tranne in caso di infiammazione. L'epitelio giunzionale ha una superficie libera sul fondo del solco gengivale. Come l'epitelio sulcolare orale e l'epitelio orale, anche l'epitelio giunzionale è continuamente rinnovato dalle divisioni cellulari nello strato basale. Le cellule migrano fino alla base del solco gengivale da cui poi si desquamano. Il confine fra epitelio giunzionale ed epitelio sulcolare orale è indicato dalle frecce. Le cellule dell'epitelio sulcolare orale hanno forma cuboide e la superficie di questo epitelio è cheratinizzata. Le cellule dell'epitelio giunzionale sono organizzate in uno strato basale e in parecchi strati sovrabasali. Le cellule basali e quelle sovrabasali risultano appiattite, con l'asse maggiore parallelo alla superficie del dente. Gli epiteli sulcolare orale, orale e giunzionale presentano caratteristiche differenti: in rapporto al volume del tessuto, la grandezza delle cellule dell'epitelio giunzionale è maggiore di quella delle cellule dell'epitelio orale; inoltre, sempre in rapporto al volume del tessuto, lo spazio intercellulare dell'epitelio giunzionale è comparativamente più ampio di quello dell'epitelio orale; infine, il numero di desmosomi è più basso nell'epitelio giunzionale che in quello orale. Le cellule basali dell'epitelio giunzionale non siano in contatto diretto con lo smalto. Fra lo smalto e l'epitelio esiste una zona elettrone-densa e una zona elettrone-trasparente.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

Quest'ultima è in contatto con le cellule dell'epitelio giunzionale. Tali zone hanno una struttura molto simile a quella della lamina densa e della lamina lucida nell'area della membrana basale, cioè a livello dell'interfaccia tra epitelio e tessuto connettivo. Inoltre, la membrana cellulare delle cellule dell'epitelio giunzionale contiene emidesmosomi sia nella parte rivolta verso lo smalto sia in quella rivolta verso il tessuto connettivo. Quindi, l'interfaccia fra smalto ed epitelio giunzionale è simile all'interfaccia fra epitelio e tessuto connettivo. La zona elettrone-densa fra l'epitelio giunzionale e lo smalto può essere considerata come continuazione della lamina densa che nella membrana basale è rivolta verso il tessuto connettivo. Similmente, la zona elettrone-trasparente può essere considerata come continuazione della lamina lucida. Si dovrebbe notare, tuttavia, che diversamente da quanto si osserva nell'interfaccia tra epitelio e tessuto connettivo, non si hanno fibre di ancoraggio attaccate alla struttura simile alla lamina densa adiacente allo smalto. Però, come le cellule basali adiacenti alla membrana basale (nell'interfaccia con il tessuto connettivo), anche le cellule dell'epitelio giunzionale che guardano verso la struttura simile alla lamina lucida contengono emidesmosomi. Quindi l'interfaccia tra l'epitelio giunzionale e lo smalto è strutturalmente molto simile all'interfaccia tra l'epitelio e il tessuto connettivo, il che significa che l'epitelio giunzionale è non solo in contatto con lo smalto, ma realmente e fisicamente attaccato al dente per mezzo degli emidesmosomi. L'elemento tessutale predominante della gengiva è il connettivo (lamina propria). Componenti principali del tessuto connettivo sono le fibre collagene (circa il 60% del volume del tessuto connettivo), i fibroblasti (circa il 5%) e i vasi e i nervi (circa il 35%), immersi in una sostanza fondamentale amorfa (matrice). Ci sono molti esempi che mostrano come durante lo sviluppo embrionale di vari organi si verifici una reciproca influenza induttiva fra epitelio e tessuto connettivo. Lo sviluppo dei denti è un esempio caratteristico di tale fenomeno. Se, da una parte, il

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

tessuto connettivo è un fattore determinante per il normale sviluppo del germe dentario, l'epitelio dello smalto esercita, d'altra parte, un'influenza ben definita sullo sviluppo dei componenti mesenchimali del dente. E' stato ipotizzato che la differenziazione tessutale nell'organismo adulto possa essere influenzata da fattori ambientali. La cute e le mucose, per esempio, mostrano spesso un'aumentata cheratinizzazione e un'iperplasia dell'epitelio nelle aree esposte alla stimolazione. I tessuti, quindi, sembrano adattarsi agli stimoli ambientali. Così si è ritenuto in passato che la presenza di epitelio cheratinizzato sulla mucosa masticatoria fosse il risultato di un adattamento all'irritazione meccanica causata dalla masticazione. Però la ricerca ha dimostrato che le caratteristiche dell'epitelio in tali aree sono determinate geneticamente. In uno studio su scimmia, la gengiva e la mucosa alveolare sono state trasposte chirurgicamente. La mucosa alveolare è stata posta in stretto contatto con i denti, mentre la gengiva è stata posizionata nell'area della mucosa alveolare. A distanza di quattro mesi dall'intervento di trasposizione, pur restando mobile nei confronti dell'osso sottostante come la mucosa alveolare, la gengiva innestata ha mantenuto le sue caratteristiche morfologiche di mucosa masticatoria. Si è però rigenerata una stretta fascia di nuova gengiva cheratinizzata fra la mucosa alveolare e i denti. A livello istologico, l'epitelio che ricopriva il tessuto gengivale innestato mostrava uno strato di cheratina ben distinto sulla superficie e anche la configurazione dell'interfaccia epitelio-tessuto connettivo (cioè le digitazioni e le papille connettivali) era simile a quella di una gengiva normale non innestata. Quindi il tessuto gengivale localizzato eterotopicamente ha mantenuto la sua specificità originale. Questa osservazione dimostra che le caratteristiche della gengiva sono determinate geneticamente, più che essere il risultato di un adattamento funzionale agli stimoli ambientali. Dopo l'intervento di trasposizione, la mucosa alveolare è stata posta in stretto contatto con i denti. Dopo la guarigione si è sviluppata una stretta zona di gengiva cheratinizzata posta

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

in sede coronale alla mucosa alveolare trapiantata. Questa nuova zona di gengiva, era ricoperta da epitelio cheratinizzato e il tessuto connettivo non conteneva fibre elastiche; inoltre la giunzione fra epitelio cheratinizzato ed epitelio non cheratinizzato corrispondeva esattamente alla giunzione fra tessuto connettivo "elastico" e "non elastico". il tessuto connettivo della nuova gengiva è stato generato dal tessuto connettivo dell'area sopralveolare e del legamento parodontale e ha separato il trapianto di mucosa alveolare dal dente. E' molto probabile che l'epitelio che ricopriva la nuova gengiva sia migrato dall'epitelio adiacente della mucosa alveolare. A livello schematico, nella stretta zona di nuova gengiva cheratinizzata, il tessuto di granulazione è proliferato coronalmente lungo la superficie radicolare e ha separato l'innesto di mucosa alveolare dal suo contatto con la superficie del dente. Le cellule epiteliali sono migrate dall'innesto di mucosa alveolare al tessuto connettivale gengivale neoformato. Quindi la gengiva neoformata è stata ricoperta da un epitelio cheratinizzato originato dall'epitelio non cheratinizzato della mucosa alveolare. Ne deriva che il tessuto connettivo gengivale neoformato possiede la capacità di indurre modificazioni nella differenziazione dell'epitelio che origina dalla mucosa alveolare. Questo epitelio, normalmente non cheratinizzato, si è differenziato in epitelio cheratinizzato in seguito agli stimoli provenienti dal tessuto connettivo gengivale neoformato. In un altro studio su scimmia, sono state innestate due porzioni, un di tessuto connettivo gengivale e l'altra di tessuto connettivo della mucosa alveolare, in aree riceventi situate nella mucosa alveolare. L'epitelizzazione di questi innesti può avvenire soltanto attraverso la migrazione di cellule epiteliali della mucosa alveolare circostante. Dopo riepitelizzazione, la porzione di tessuto ha assunto un aspetto simile a quello della gengiva normale, il che sta a indicare che il tessuto connettivo era ricoperto da un epitelio cheratinizzato. Il tessuto connettivo innestato dalla mucosa alveolare era ricoperto da un epitelio non cheratinizzato e aveva lo stesso

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

aspetto della mucosa alveolare. A livello istologico, confrontando le sezioni dei due tessuti si poteva rilevare che il tessuto connettivo gengivale innestato era ricoperto da epitelio cheratinizzato, mentre l'interfaccia fra epitelio e tessuto connettivo aveva lo stesso decorso ondulato (caratterizzato da digitazioni e papille connettivali) che si osserva nella gengiva normale. Nell'area di confine tra la mucosa alveolare e il tessuto connettivo gengivale innestato, apparivano evidenti le relazioni fra epitelio cheratinizzato e tessuto connettivo non elastico e tra epitelio non cheratinizzato e tessuto connettivo elastico. L'instaurarsi di queste relazioni dimostrava come il tessuto connettivale gengivale innestato possedeva la capacità di alterare la differenziazione delle cellule epiteliali, come precedentemente indicato. Dal loro strato di cellule non cheratinizzate, le cellule dell'epitelio della mucosa alveolare si trasformano in cellule cheratinizzate. Da ciò si deduce che la specificità dell'epitelio gengivale è determinata da fattori genetici propri del tessuto connettivo.

1.2 L'IMPORTANZA DEL TESSUTO

CHERATINIZZATO PER LA SALUTE ORALE

1.2.1 Gengiva aderente: considerazioni anatomiche

Uno dei requisiti per un esame parodontale completo è rappresentato da una valutazione della banda di gengiva aderente. L'obiettivo di questa valutazione, secondo le linee guida convenzionali, è di determinare se questa banda risulti adeguata. Questo ha spinto i clinici a domandarsi quale sia il significato di questa banda gengivale, i valori per cui si può ritenere adeguata e quali siano le rilevanze cliniche che tutto questo può portare. Storicamente i parodontologi hanno ritenuto indicato un aumento gengivale per ricreare queste zone di gengiva aderente. All'inizio si pensava che la gengiva aderente fosse importante per dissipare le forze di trazione muscolare, e per minimizzare la quota di mucosa che con la sua mobilità può accumulare maggiormente la placca^{1,2}; inoltre si pensava che la gengiva cheratinizzata fosse più idonea a sopportare i traumi masticatori e da spazzolamento³. Studi successivi hanno dimostrato che, più che l'altezza, risulta indispensabile un certo spessore di gengiva aderente attorno a denti restaurati o spostati ortodonticamente⁴⁻⁸. Dal punto di vista degli interventi parodontali chirurgici e non, diversi studi hanno dimostrato come sia richiesto uno spessore gengivale di almeno 1 mm di spessore per prevenire recessioni in seguito a scaling e root planing²¹, e ottenere risultati predicibili in procedure quali ricoperture radicolari²² e rigenerazioni ossee guidate²³. I clinici sono tutt'ora scettici ad accettare il fatto che possa non essere necessaria una certa banda di tessuto cheratinizzato attorno ad un dente o ad un impianto; questo può essere dovuto al fatto che risulta impossibile immaginare uno spessore adeguato senza avere anche

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

un'altezza adeguata. Mentre le attuali prove scientifiche danno maggior rilevanza clinica allo spessore piuttosto che all'altezza del tessuto cheratinizzato per assicurare la salute dei tessuti molli ed evitare recessioni, rimane il problema clinico sulla maggior difficoltà nel misurare lo spessore rispetto all'ampiezza della gengiva aderente; di conseguenza, potrebbe non essere del tutto priva di fondamento la convinzione clinica che sia comunque necessaria una adeguata ampiezza di mucosa aderente per il successo clinico della terapia. In generale, delle manovre di aumento del tessuto molle gengivale possono essere giustificate quando il paziente lamenta un disagio durante lo spazzolamento dei denti nelle aree con una banda aderente inadeguata, quando la terapia ortodontica causa movimenti al di fuori dell'alveolo in pazienti con biotipo tissutale sottile, quando occorre un miglior risultato in seguito a ricoperture radicolari in pazienti che lamentano ipersensibilità o scarsa estetica in caso di recessioni²⁴.

Per molti anni la presenza di una zona adeguata di gengiva è stata considerata d'importanza critica per il mantenimento della salute dei tessuti marginali e per la prevenzione della perdita di attacco connettivale. I clinici avevano l'impressione che i siti con una banda di gengiva stretta fossero spesso infiammati, mentre le ampie zone di gengiva presenti a livello dei denti adiacenti rimanessero in salute. Il concetto fondamentale, pertanto, era che una stretta banda di gengiva aderente fosse insufficiente a proteggere il parodonto dagli insulti causati dalle forze frizionali che si sviluppano durante la masticazione e a dissipare la trazione esercitata sul margine gengivale dai muscoli della mucosa alveolare adiacente. Si riteneva inoltre che una banda inadeguata di gengiva avrebbe facilitato la formazione di placca sottogengivale, a causa dell'insufficiente sigillo della tasca dovuto alla mobilità del margine gengivale, e favorito la perdita di attacco e la recessione dei tessuti marginali, a causa della minore resistenza tissutale alla diffusione apicale delle lesioni gengivali dovute alla placca batterica. Si

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

presumeva altresì che una gengiva inadeguata, unitamente ad un fornice vestibolare poco profondo, potesse favorire l'accumulo di residui di cibo durante la masticazione e impedire adeguate misure di igiene orale. Le opinioni su ciò che si intendeva per dimensioni gengivali "adeguate" o "sufficienti" erano diverse. Mentre alcuni autori proponevano che potesse essere sufficiente meno di 1 mm di gengiva, altri sostenevano che l'estensione apico-coronale del tessuto cheratinizzato dovesse essere superiore ai 3 mm. Un terzo gruppo di autori, utilizzando un approccio più biologico, affermava che una quantità adeguata di gengiva è quella che risulta compatibile con la salute gengivale o che previene la retrazione del margine gengivale durante i movimenti della mucosa alveolare.

1.2.2 Dimensione gengivale e salute parodontale

Uno dei primi studi nei quali si tentò di valutare il significato della dimensione gengivale per il mantenimento della salute parodontale fu realizzato su studenti in odontoiatria sottoposti, una volta al giorno per 6 settimane, a sedute di igiene professionale. Tutti i siti buccali e linguali erano stati esaminati per quanto riguarda la placca, le condizioni gengivali e l'estensione apico-coronale della gengiva. I risultati dimostrarono che, nonostante le superfici dentali fossero prive di placca, tutti i siti con meno di 2 mm di gengiva presentavano segni clinici persistenti di infiammazione. In base a questa osservazione, gli autori indicarono che 2 mm di gengiva rappresentavano un'ampiezza adeguata per il mantenimento della salute gengivale. D'altra parte, i risultati derivanti da studi clinici controllati non hanno supportato il concetto di una quantità minima richiesta di gengiva. In questi studi, infatti, è stato dimostrato che è possibile mantenere clinicamente sane anche le regioni marginali che presentano meno di 1 mm di tessuto cheratinizzato. Inoltre, quando i soggetti sospendevano le misure di igiene orale per un periodo di

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

25 giorni, non si riscontrava alcuna differenza nello sviluppo dei segni clinici dell'infiammazione gengivale tra le aree con una minima ampiezza di gengiva e le zone con una estensione apprezzabile. In un altro studio, utilizzando come modello di studio il cane beagle, hanno cercato di stabilire se un tessuto marginale ben saldo, come la gengiva aderente, rappresentasse un fattore critico per il mantenimento della salute parodontale. In questi studi sono state definite, in base alle differenti caratteristiche cliniche, le seguenti unità dentogengivali: unità con una zona di tessuto cheratinizzato stretto e sottile e unità con una gengiva ampia e ben aderente. Grazie al controllo quotidiano della placca, tutte le unità gengivali erano prive di segni clinici e istologici d'infiammazione, indipendentemente dalla presenza o assenza di gengiva aderente. Quando era stato permesso alla placca batterica di accumularsi per 40 giorni, i segni clinici di infiammazione (arrossamento e gonfiore) erano più pronunciati nelle regioni che presentavano una gengiva aderente. Tuttavia l'esame istologico dimostrava che l'ampiezza dell'infiltrato infiammatorio e la sua estensione apicale (una valutazione, questa, che può essere usata come stima indiretta della migrazione apicale della placca batterica) risultavano simili nelle due unità dentogengivali. E' stato inoltre provato che, rispetto alle unità gengivali che presentavano un tessuto ben saldo, le zone prive di gengiva aderente possedevano una dimensione buccolinguale inferiore e un epitelio orale di rivestimento con uno strato cheratinizzato più sottile. Probabilmente questi aspetti morfologici rendono più visibile il sistema vascolare della gengiva e possono perciò permettere di spiegare perché zone con una minima quantità gengivale appaiono clinicamente più infiammate rispetto a quelle con una più ampia banda di gengiva aderente. Il fatto che i segni clinici di infiammazione gengivale non corrispondano alle dimensioni dell'infiltrato infiammatorio dimostra le difficoltà inerenti all'interpretazione dei dati desunti dall'esame clinico di zone con diversa ampiezza gengivale. Ciò dovrebbe essere tenuto presente quando si

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

interpretano i dati dello studio dimostranti come i segni clinici visibili di infiammazione, come l'arrossamento e i gonfiore, siano più frequenti nelle zone con meno di 2 mm di gengiva rispetto alle aree con una banda gengivale più ampia. La necessità e l'efficacia dell'aumento gengivale per il mantenimento dell'attacco parodontale sono state esaminate in uno studio. 92 pazienti, che presentavano una quantità minima di tessuto cheratinizzato (ossia inferiore a 2 mm) a livello di superfici vestibolari bilaterali, sono stati trattati con un innesto libero gengivale da un lato, mentre la regione controlaterale non subiva alcun intervento, fungendo da sito di controllo. Prima e dopo l'intervento, fungendo da sito di controllo. Prima e dopo l'intervento chirurgico, i pazienti erano sottoposti a rimozione meccanica del tartaro e levigatura radicolare e istruiti sulle misure di igiene orale. Come atteso, gli autori hanno riscontrato un aumento significativo (circa 4 mm) dell'ampiezza del tessuto cheratinizzato a livelli dei siti trattati chirurgicamente e tale incremento della gengiva era mantenuto per un periodo di follow-up pari a 2 anni. Lo stesso accadeva per il livello di attacco, mantenutosi durante il medesimo arco di tempo. Nei siti di controllo l'ampiezza iniziale della gengiva era inferiore a 2 mm e non aveva subito modifiche significative durante i 2 anni di osservazione, tuttavia il livello di attacco era rimasto immutato anche in questi siti. Perciò una banda sottile di gengiva, evidentemente, possiede la stessa resistenza alla perdita di attacco di una più ampia. I controlli a 4 e 6 anni hanno confermato i risultati del precedente controllo a 2 anni. Nemmeno in un altro studio su 34 pazienti è stato possibile dimostrare differenze dopo 1-8 anni tra i siti innestati e quelli non innestati in relazione alla salute gengivale e alla profondità delle tasche, valutando gli effetti a lungo termine di innesti liberi di tessuto molle sulla salute parodontale. Gli autori hanno concluso che, mentre un innesto libero gengivale costituisce un mezzo efficace per aumentare la gengiva, non vi sono indicazioni che tale aumento presenti un effetto diretto sulla salute parodontale.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

Questa conclusione conferma i risultati di uno studio in cui è stata esaminata in 12 pazienti l'efficacia di innesti liberi gengivali a livello di coppie di denti mandibolari omologhi e controlaterali con meno di 1 mm di gengiva aderente. Questi autori, raffrontando longitudinalmente i siti testati con quelli controllo, non hanno riscontrato differenze significative per ciò che riguarda la salute parodontale.

1.2.3 Salute parodontale e terapie pedo-ortodontiche

Nei pazienti pediatrici, la prevalenza delle problematiche muco-gengivali si attesta sul 12-19% secondo uno studio di Maynard¹⁵, mentre uno di Pearson¹⁶ afferma che la prevalenza equivale al 7,8%. Secondo questi studi, l'ampiezza della mucosa cheratinizzata è influenzata dal pattern di eruzione del dente, labiale o linguale per esempio, e dalla sua posizione finale all'interno dell'alveolo. Ad esempio, una eruzione labiale è associata ad una corticale labiale sottile ed una minor ampiezza della gengiva aderente. Bimstein¹⁷ ha inoltre puntualizzato che immediatamente dopo l'eruzione, un elemento dentario permanente è privo di gengiva aderente, poiché la profondità del solco supera l'ampiezza della gengiva cheratinizzata. La gengiva aderente cresce gradualmente nelle dimensioni e può impiegare diversi anni per raggiungere le dimensioni adulte. I risultati di ricerche cliniche e sperimentali hanno dimostrato che la maggior parte delle terapie ortodontiche è innocua per il parodonto. Il clinico, tuttavia, può aver avuto esperienza di pazienti che rispondono con recessione gengivale e perdita di attacco agli spostamenti dei denti incisivi in senso frontale e ai movimenti laterali dei denti posteriori. Basandosi sull'osservazione clinica secondo la quale possono svilupparsi recessioni durante la terapia ortodontica quando questa interessa zone che possiedono una quantità insufficiente di gengiva, è stato proposto che, in tali aree,

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

le tecniche di innesto finalizzate ad aumentare l'ampiezza gengivale debbano precedere l'inizio della terapia ortodontica. La presenza di una deiscenza dell'osso alveolare è considerata un prerequisito per lo sviluppo di una recessione dei tessuti marginali; ossia, una deiscenza radicolare può determinare un ambiente che, per un motivo o per l'altro, conduce alla perdita di tessuto gengivale. In relazione alla terapia ortodontica, ciò implica che fino a quando un dente non viene spostato esclusivamente all'interno dell'osso alveolare, la recessione dei tessuti molli non si svilupperà. D'altra parte, le deiscenze dell'osso alveolare che predispongono alla recessione possono essere indotte dall'espansione buccale incontrollata dei denti attraverso la corticale ossea, rendendo così i denti suscettibili allo sviluppo di recessione dei tessuti molli. A questo proposito, è interessante notare che studi sperimentali hanno dimostrato che l'osso vestibolare si riforma nell'area della deiscenza quando il dente viene retratto sino ad un posizionamento corretto della radice nel processo dell'osso alveolare. E' perciò probabile che per un dente precedentemente posizionato in una zona prominente vestibolare e poi spostato in una posizione più adeguata all'interno del processo alveolare la riduzione della recessione si accompagni alla formazione di osso. Le alterazioni che avvengono nelle dimensioni gengivali e nella posizione dei tessuti marginali in seguito alla terapia ortodontica sono legate alla direzione del movimento dentario. I movimenti in direzione facciale determinano una riduzione delle dimensioni vestibolari della gengiva, mentre si osserva un loro aumento in seguito a spostamenti linguali. In uno studio condotto su scimmia, in cui si è indagato le modificazioni dei tessuti molli sia in seguito ai movimenti di inclinazione e di estrusione sia in seguito a spostamenti massivi dei denti incisivi. E' stato riportato che tali movimenti dentali determinano la recessione del margine gengivale vestibolare e la perdita di attacco. Tuttavia, ricerche concepite in modo simile, effettuate nel cane e nell'uomo, non sono state in grado di dimostrare che i movimenti di vestibolarizzazione si

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

accompagnano a recessione dei tessuti marginali e a perdita d'attacco. Questa discrepanza tra gli studi riportati sulla risposta dei tessuti molli marginali alla terapia ortodontica è difficile da comprendere, ma può essere dovuta a differenze relative all'entità dello spostamento vestibolare, all'intensità della forza applicata, alla presenza o assenza di placca e di infiammazione gengivale nelle regioni sottoposte al movimento dentale e/o a differenze concernenti le dimensioni gengivali. In uno studio gli autori hanno indagato i meccanismi in base ai quali il tessuto gengivale può andare perduto come risultato del movimento del dente in direzione buccale, ipotizzando che un fattore importante possa essere rappresentato dalla tensione creata nei tessuti marginali dalle forze applicate ai denti. Se questa ipotesi si rivelasse valida, ovviamente sarebbe il volume (ossia lo spessore) dei tessuti gengivali sul lato di pressione, piuttosto che la sua altezza apico-coronale, a determinare la possibilità che si verifichi o no la recessione dei tessuti marginali durante la terapia ortodontica. Una conferma a questa ipotesi deriva da uno studio sperimentale nelle scimmie nel quale i denti spessore e qualità variabili di tessuto molle marginale. In seguito a movimenti corporei dei denti incisivi in direzione vestibolare attraverso l'osso alveolare, la maggior parte dei denti mostrava una limitata migrazione apicale del margine dei tessuti molli, senza perdita di attacco connettivale. In altre parole, tale migrazione apicale del margine gengivale costituisce il risultato di una ridotta altezza della gengiva libera, che a sua volta, può essere dovuta alla tensione, vale a dire allo stiramento, sviluppatosi nei tessuti molli durante il movimento di vestibolarizzazione e al ridotto spessore del tessuto buccolinguale. Similmente ai risultati presentati dagli autori di uno studio condotto sull'uomo, non è stata trovata una relazione fra l'ampiezza (altezza) apico-coronale iniziale della gengiva e il grado di migrazione apicale del margine dei tessuti molli durante la terapia ortodontica. Perciò le conclusioni raggiunte non supportano l'ipotesi che sia essenziale disporre di una

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

certa quantità di gengiva per prevenire la recessione durante la terapia ortodontica, ma piuttosto confermano le osservazioni cliniche riportate in uno studio in base alle quali, durante la terapia ortodontica, è possibile mantenere l'integrità del parodonto anche nelle zone che presentano una minima quantità di gengiva aderente. In un altro studio gli autori hanno riferito i denti che, avendo subito una perdita di attacco connettivale durante il movimento ortodontico di vestibolarizzazione, mostravano segni clinici di infiammazione durante il periodo sperimentale. Poiché è stato dimostrato che, in presenza di lesioni sopraossee dovute alla placca, le forze ortodontiche che generano un movimento corporeo del dente non sono in grado di accelerare la distruzione dell'attacco connettivale, si può assumere che lo stiramento della gengiva vestibolare possa favorire l'effetto distruttivo della lesione infiammatoria indotta dalla placca a causa della diminuita dimensione buccolinguale del tessuto marginale. Questa affermazione è convalidata dall'osservazione che, in presenza di gengivite indotta dalla placca, un margine dei tessuti molli sottile è più suscettibile a una completa distruzione rispetto a uno più spesso. Inoltre, poiché una simile perdita di attacco è stata evidenziata in denti infettati dalla placca spostati in corpore all'interno dell'osso alveolare, indipendentemente dal tipo di tessuto molle presente (gengiva o mucosa alveolare), lo spessore, piuttosto che la qualità dei tessuti molli marginali nel lato di pressione, sembra rappresentare il fattore determinante per lo sviluppo della recessione durante la terapia ortodontica in denti infettati dalla placca. Perciò, tutte le osservazioni condotte nel corso degli studi discussi in precedenza sottolineano l'importanza di un adeguato controllo della placca durante il trattamento ortodontico. L'implicazione clinica derivante dai risultati degli studi esaminati risiede nel fatto che il movimento di vestibolarizzazione deve essere preceduto da un attento esame delle dimensioni dei tessuti che ricoprono la superficie vestibolare dei denti da spostare. Se il dente può essere mosso nell'ambito del

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

processo alveolare, il rischio di effetti nocivi sui tessuti marginali è minimo, indipendentemente dalle dimensioni e dalla qualità dei tessuti molli. Se però si prevede che il movimento dentale possa causare una deiscenza dell'osso alveolare, il volume (spessore) dei tessuti molli di rivestimento deve essere considerato come un fattore in grado di influenzare lo sviluppo di una recessione dei tessuti molli durante e/o dopo la fase attiva della terapia ortodontica. Dal punto di vista ortodontico, diversi studi¹⁸⁻²⁰ affermano che se i movimenti vengono mantenuti all'interno dell'osso alveolare ed il paziente mantiene livelli adeguati di controllo della placca batterica, non è indicata alcuna procedura di aumento gengivale. D'altra parte, se esistono i presupposti per cui i movimenti ortodontici dell'elemento possano causare deiscenze, allora va attentamente valutato lo spessore del tessuto gengivale: l'aumento gengivale è indicato prima di applicare forze ortodontiche in caso di biotipo gengivale sottile, al fine di prevenire perdite di attacco poco predicibili. Viceversa, se il biotipo si presenta spesso, può essere più indicato rivalutare il bisogno di aumenti gengivali a fine terapia ortodontica.

1.2.4 Banda gengivale e salute implantare

La differenza anatomica basilare fra impianto e radice risiede nell'inserimento di tessuto connettivo a livello del collo implantare. Nell'elemento dentario, le fibre del tessuto connettivo si inseriscono nel cemento mentre corrono parallele alla superficie implantare e formano un collare intorno ad esso. Gli elementi della teoria secondo cui è necessaria una certa quota di gengiva aderente attorno all'impianto sono stati giustificati da diversi fattori. Questi fattori sono impressioni cliniche o interpretazioni di principi anatomici e fisiologici. Per molto tempo si è pensato che una certa quantità di gengiva aderente attorno al collo implantare aiuti a mantenere un certo grado di comfort per il paziente in

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

particolare riguardo alla resistenza dal trauma da spazzolamento durante le manovre di igiene orale, specialmente in pazienti con atrofie severe che portano ad una retrazione da parte della lingua e del labbro rendendo più difficoltosi gli sforzi per l'igiene corretta; inoltre si pensava che un epitelio di tipo non cheratinizzato potesse impedire la formazione dell'epitelio giunzionale funzionale, mentre la mucosa alveolare, a causa della sua elasticità e la sua natura mobile, potesse continuamente ostacolare la formazione di un sigillo epiteliale attorno all'impianto; infine si pensava che potesse esserci un prolasso dei tessuti in seguito alla cementazione o rimozione delle componenti protesiche⁹. I risultati della terapia implantare possono essere suddivisi in sopravvivenza e successo. Studi a lungo termine^{10,11} hanno dimostrato come l'ampiezza della banda di gengiva aderente non ha nessuna implicazione sul grado di sopravvivenza dell'impianto. D'altra parte, se si guarda al grado di successo, vanno prese in considerazione delle complicazioni biologiche quali peri-implantiti e considerazioni estetiche in termini di recessioni. Le recessioni del margine gengivale a livello dei siti implantari nel mascellare anteriore rappresentano una seria complicanza. I biotipi gengivali sono stati classificati in base al loro volume e alla loro architettura in due tipologie: quella sottile e molto festonata e quella spessa e piatta. Un paziente con una gengiva sottile e molto festonata ha un alto rischio di recessioni e di compromissione dell'estetica dei tessuti molli. Sarebbe quindi auspicabile assicurarsi una ampiezza adeguata di gengiva aderente prima del posizionamento di impianti nella zona estetica. Va comunque detto che la questione sulla suscettibilità alla peri-implantite nei siti con mucosa non cheratinizzata è ancora controversa. In uno studio¹², impianti senza gengiva cheratinizzata hanno mostrato significativamente più episodi di recessioni rispetto agli altri impianti, in un condizioni di accumulo di placca. In un altro studio su beagle, non sono state trovate differenze significative fra impianti orali endossei con o senza gengiva

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

aderente vestibolare, in presenza o assenza di controllo della placca. confrontando la posizione del margine gengivale e del livello d'attacco. Studi clinici longitudinali suggeriscono che l'ampiezza della gengiva aderente non è significativa per mantenere la salute peri-implantare finchè viene mantenuto il controllo della placca. In uno studio longitudinale a 5 anni su impianti a supporto di overdenture è stato visto come il tessuto peri-implantare possa essere mantenuto indipendentemente dal fatto che l'impianto venga inserito in mucosa orale o mucosa cheratinizzata. Comunque, recenti evidenze hanno mostrato un trend opposto. manovre di aumento gengivale possono essere quindi indicate in certe situazioni, anche se mancano sufficienti prove a livello della letteratura internazionale. Attualmente è stabilito che un impianto endosseo con scarsa o assente banda di gengiva aderente ha comunque una buona prognosi, e la sua salute peri-implantare può essere mantenuta a condizione di una buon livello di igiene orale. Va detto che nelle aree particolarmente estetiche o in pazienti con un controllo difficoltoso della placca, sarebbe preferibile realizzare un impianto che emerga da una gengiva di tipo cheratinizzato^{13,14}.

1.3. TECNICHE DI AUMENTO GENGIVALE

1.3.1 Indicazioni

L'aumento della gengiva può essere preso in considerazione quando il paziente abbia lamentato fastidio durante lo spazzolamento e/o la masticazione, per interferenza da parte della mucosa di rivestimento. Inoltre, quando si pianifica un movimento ortodontico del dente e si prevede che, a causa della posizione finale del dente stesso, si possa sviluppare una deiscenza dell'osso alveolare, l'aumento di spessore dei tessuti molli di ricopertura può ridurre il rischio di sviluppo di una recessione. Un aumento dello spessore del margine gengivale può, in certe situazioni, essere preso in considerazione anche quando si posizionano ricostruzioni sotto il margine gengivale in corrispondenza di zone con tessuti molli marginali sottili. Le tecniche di aumento della gengiva comprendono una serie di procedure chirurgiche, la maggior parte delle quali, tuttavia, è stata sviluppata soprattutto in maniera empirica e senza la necessaria conoscenza della biologia dei tessuti coinvolti. Le prime tecniche descritte furono i cosiddetti "interventi di estensione vestibolare", che erano stati ideati con lo scopo principale di aumentare la profondità del fornice. In anni più recenti, tuttavia, le tecniche di maggior impiego nel trattamento di zone con dimensioni gengivali inadeguate sono state quelle che si avvalgono di innesti di lembi, peduncolati o di lembi liberi di tessuto molle, in virtù di risultati prevedibilmente superiori.

1.3.2 Tecniche di estensione vestibolare/gengivale

Le tecniche di denudazione prevedevano la rimozione di tutto il tessuto molle nell'area che va dal margine gengivale a un livello apicale alla giunzione mucogengivale, lasciando l'osso alveolare completamente esposto. La guarigione delle zone trattate in questo modo determinava sovente un aumento dell'altezza della zona gengivale, anche se, in alcuni casi, i risultati conseguiti erano molto modesti. L'esposizione dell'osso alveolare, tuttavia, dava luogo a un riassorbimento osseo grave, con conseguente perdita permanente di altezza ossea. Inoltre, spesso la recessione della gengiva marginale nell'area chirurgica superava il guadagno di gengiva conseguito nella porzione apicale della ferita. A causa di queste complicazioni e del forte dolore postoperatorio provato dal paziente, le tecniche di denudazione sono oggi difficilmente giustificabili. Nella tecnica di ritenzione del periostio o lembo a spessore parziale viene rimossa solo la parte superficiale della mucosa orale nell'area della ferita, lasciando l'osso coperto dal periostio comporti un minore riassorbimento osseo rispetto a quanto si verifici in seguito a tecniche di denudazione, anche dopo questo tipo di intervento si osserva una perdita d'altezza della cresta ossea, a meno che non venga mantenuto sulla superficie ossea uno strato relativamente spesso di tessuto connettivo. Se non si mantiene questo strato ampio, il tessuto connettivo periostale tende ad andare in necrosi e la guarigione che ne deriva assomiglia molto a quella riscontrabile dopo le tecniche di denudazione analizzate in precedenza. Altre tecniche descritte di estensione gengivale possono essere considerate come modifiche o combinazione degli interventi di denudazione e di quelli a lembo a spessore parziale. Il lembo riposizionato apicalmente, per esempio, prevede lo scollamento di lembi di tessuto molle e il loro riposizionamento, per mezzo di suture, in una posizione più apicale, lasciando sovente 3-5 mm di osso alveolare denudato nella porzione coronale

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

dell'area dell'intervento, ma ciò porta ai medesimi rischi di esteso riassorbimento osseo mostrato dalle altre tecniche di denudazione. Friedman riteneva che con il lembo riposizionato apicalmente fosse possibile predire l'aumento post-chirurgico dell'ampiezza gengivale, ma altri studi hanno indicato che molto spesso, l'ampiezza preoperatoria della gengiva rimane semplicemente inalterata o, al più risulta aumentata solo di poco. Le tecniche di estensione gengivale/vestibolare appena descritte si basavano sull'assunto che fossero le forze frizionali, sviluppate durante la masticazione, a determinare la presenza di tessuto cheratinizzato in prossimità dei denti. Perciò si presumeva che, spostando le inserzioni muscolari e aumentando la profondità del vestibolo, il tessuto rigenerato nell'area di intervento sarebbe stato sottoposto a impatti fisici e pertanto si sarebbe adattato agli stessi requisiti funzionali della gengiva normale. Ricerche successive hanno dimostrato che le caratteristiche della gengiva sono il risultato di fattori intrinseci al tessuto, piuttosto che di un adattamento funzionale, e che la differenziazione (cheratinizzazione) dell'epitelio gengivale è controllata da stimoli morfogenetici provenienti dal sottostante tessuto connettivo.

1.3.3 Tecniche di innesto

I tessuti molli gengivali e palatali mantengono le loro caratteristiche originarie anche dopo essere stati trapiantati in aree di mucosa alveolare, perciò il ricorso a trapianti offre la possibilità di potere prevedere i risultati postchirurgici. I tipi di trapianto utilizzati possono essere divisi in innesto di lembi peduncolati, i quali, dopo il loro posizionamento nel sito ricevente, mantengono la loro connessione con il sito donatore innesti liberi, i quali, al contrario, non mantengono alcun collegamento con la regione donatrice. Questi ultimi sono utilizzati più spesso per aumentare la gengiva. Storicamente, i metodi per aumentare il tessuto

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

cheratinizzato a livello della mucosa masticatoria comprendono: i lembi riposizionati apicalmente, i lembi riposizionati apicalmente combinati a tessuto autologo oppure combinati a tessuto allogenico. Gli svantaggi nell'utilizzo di tessuto autologo sono principalmente dovuti alle procedure di prelievo, le quali portano a lunghi tempi di guarigione del sito donatore e quindi ad un aumento della morbilità del paziente. Il paziente inoltre spesso si lamenta del dolore e del disagio per diverse settimane successive all'intervento. D'altro canto esistono particolari limitazioni anatomiche e individuali. A seconda della forma della volta palatale, del sesso e dell'età del paziente, può variare la qualità e la quantità del tessuto che è possibile prelevare. Il decorso dei vasi e dei fasci nervosi palatali limita ulteriormente la quantità totale ottenibile per le procedure d'innesto. Proprio per superare queste problematiche concernenti l'utilizzo di tessuto autologo, sono stati sviluppate delle tecniche e dei materiali alternativi prevalentemente di origine allogenica. Tra i primi prodotti introdotti nella chirurgia mucogengivale troviamo innesti di pelle congelata e disidratata, usati inizialmente come sostituti degli innesti gengivali liberi in combinazione con un lembo riposizionato apicalmente per l'incremento di tessuto cheratinizzato. Più tardi negli anni '80, sostituti dermici allogenici come l'innesto acellulare di matrice dermica sviluppato inizialmente per la copertura delle ferite da ustione a tutto spessore sono stati utilizzati per l'incremento di tessuto cheratinizzato, per le procedure di ricopertura radicolare, per l'abbassamento di fornice vestibolare e per l'aumento localizzato di difetti alveolari. Le tecniche più recenti seguono le linee guida dell'ingegneria tissutale. I prodotti dell'ingegneria tissutale sono basati su cellule isolate o sostituti cellulari (mediatori biologici), e scaffold di origine naturale o sintetica. In contrasto agli innesti acellulari di matrice dermica, gli innesti più recenti come i sostituti dermici derivati da fibroblasti umani e gli equivalenti di pelle umana includono una componente cellulare. Entrambi gli innesti sono stati studiati in trial clinici

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

paragonati a tessuto molle autologo per aumentare il tessuto cheratinizzato. Dato che le tecniche ed i materiali sono stati cambiati abbastanza estensivamente nell'arco degli ultimi decenni, c'è una mancanza di informazione ed un forte bisogno di stabilire in maniera critica la letteratura odontoiatrica per ottimizzare le procedure d'innesto in termini di aumento del tessuto molle.

1.3.4 Guarigione dopo tecniche di estensione

Poichè la specificità della gengiva è determinata da fattori intrinseci presenti nei tessuti, i risultati postoperatori delle tecniche di estensione vestibolare dipendono dal grado con cui i vari tessuti contribuiscono alla formazione del tessuto di granulazione nell'area operata. Dopo una tecnica di denudazione o a lembo a spessore parziale, la zona della ferita è invasa da tessuto di granulazione proveniente dal legamento parodontale, dagli spazi ossei midollari, dal connettivo periosteo conservato, oltre che dalla gengiva adiacente e dalla mucosa alveolare. Il grado di riassorbimento osseo indotto dal trauma chirurgico determina la quantità relativa di tessuto di granulazione che si forma in corrispondenza dalle diverse sorgenti tessutali sopra citate. Il riassorbimento della cresta ossea determina l'esposizione di quantità variabili di tessuto del legamento parodontale nella regione marginale, permettendo al tessuto di granulazione proveniente dal legamento di colmare la porzione più coronale della ferita, e quanto maggiore è la perdita di osso tanto superiore è la porzione della ferita che verrà colmata da tessuto di granulazione proveniente dal legamento parodontale. Questo particolare tessuto possiede la capacità di indurre la cheratinizzazione dell'epitelio soprastante; ciò significa che l'ampliamento del tessuto cheratinizzato riscontrabile dopo gli interventi di denudazione e a lembo a spessore parziale viene raggiunto a prezzo di un riassorbimento (una diminuzione) della cresta ossea. Di solito, la

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

tecnica di denudazione si risolve con una maggiore perdita ossea rispetto a quella riscontrabile nella guarigione del lembo a spessore parziale, perciò, dopo un intervento di denudazione e a lembo a spessore parziale, perciò, dopo un intervento di denudazione, si forma nella regione marginale una quantità di tessuto di granulazione (in grado di indurre cheratinizzazione dell'epitelio gengivale) maggiore rispetto a quella che si forma dopo un lembo a spessore parziale. Ciò è in accordo con l'osservazione clinica che la tecnica di denudazione è generalmente più efficace della tecnica a lembo a spessore parziale nell'aumentare l'ampiezza del tessuto cheratinizzato. In uno studio pubblicato da Weenstrom le tasche parodontali le tasche parodontali erano eliminate ricorrendo alla tecnica di gengivectomia oppure a lembo ed entrambi gli interventi determinavano la completa eliminazione del tessuto cheratinizzato. L'area della ferita determinata dalla gengivectomia guariva per seconda intenzione mentre nella tecnica a lembo la mucosa alveolare veniva riposizionato allo scopo di ottenere una ricopertura completa dell'osso alveolare esposto chirurgicamente. Indipendentemente dalla tecnica usata, il processo di guarigione avveniva con riformazione di tessuto cheratinizzato, la cui ampiezza, tuttavia, era comunque maggiore dopo gengivectomia piuttosto che dopo intervento a lembo. La gengiva si formava grazie alla proliferazione coronale, lungo la superficie radicolare, del tessuto di granulazione proveniente dal legamento parodontale, capace di indurre la cheratinizzazione dell'epitelio. La formazione di questo tessuto di granulazione veniva ovviamente favorita da un riassorbimento osseo più pronunciato durante il processo di guarigione successivo all'intervento di gengivectomia. Si può concludere che il successo o l'insuccesso dei tentativi di aumentare l'ampiezza del tessuto cheratinizzato, attraverso tecniche di denudazione o a lembo spessore parziale, dipendono dall'origine del tessuto di granulazione, la cui quantità, a sua volta , è determinata dal grado di riassorbimento osseo indotto dal trauma

chirurgico. Ciò significa che, in relazione alla possibilità di aumentare l'ampiezza gengivale, i metodi che comportano l'esposizione del periostio oppure che la denudazione dell'osso non offrono risultati prevedibili e il ricorso a tali interventi, pertanto, non è terapia parodontale. Le tecniche appena discusse rappresentano semplicemente un esempio di come la scarsa conoscenza dei principi biologici basilari possa condurre allo sviluppo di metodiche terapeutiche inadeguate.

1.3.4 Guarigione dopo tecniche di innesto

La guarigione di innesti liberi di tessuti molli posizionati interamente su un letto ricevente di tessuto connettivo è stata studiata nelle scimmie. Secondo questi autori, il processo di guarigione può essere diviso in tre fasi. Nella prima fase, da 0 a 3 giorni, è presente un sottile strato di essudato tra l'innesto e il letto ricevente. Per tutta questa fase il tessuto innestato sopravvive grazie alla circolazione plasmatica avascolare garantitagli dal letto ricevente; perciò è fondamentale, per la sopravvivenza dell'innesto, che si stabilisca un intimo contatto tra esso e il sito ricevente sottostante al momento dell'intervento. Uno spesso strato di essudato o un coagulo ematico può ostacolare la circolazione plasmatica e determinare il rigetto dell'innesto. L'epitelio dell'innesto libero degenera subito nella fase iniziale della guarigione e poco dopo si desquama. Se si posiziona un innesto su una recessione, parte del letto ricevente sarà costituito dalla superficie radicolare avascolare e, poichè la sopravvivenza dell'innesto dipende dalla natura del letto ricevente per la diffusione di plasma e per la successiva rivascolarizzazione, l'utilizzo di innesti liberi nel trattamento di recessioni gengivali comporta un considerevole rischio di fallimento. La porzione dell'innesto che si viene a trovare sopra la superficie avascolare della radice deve ricevere nutrimento dal letto di tessuto connettivo che circonda la recessione, pertanto la quantità di tessuto che

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

può sopravvivere sopra la superficie radicolare è limitata dall'estensione dell'area avascolare. Dopo 4-5 giorni di guarigione , si stabiliscono anastomosi tra i vasi ematici del letto ricevente e quelli del tessuto innestato ed è così ristabilita la circolazione sanguigna nei vasi ematici preesistenti nell'innesto. Il periodo successivo è caratterizzato dalla proliferazione dei capillari, che gradualmente costituiscono una densa rete di vasi nell'ambito dell'innesto; contestualmente si stabilisce una connessione di fibre connettivali tra l'innesto e il sottostante letto di tessuto connettivo. La riepitelizzazione dell'innesto avviene soprattutto grazie alla proliferazione di epitelio proveniente dai tessuti adiacenti. Se un innesto libero è posizionato sopra una superficie radicolare esposta può aver luogo, proprio in questa fase, una migrazione apicale dell'epitelio lungo la superficie dell'innesto rivolta verso la radice. Nel periodo di maturazione del tessuto, il numero di vasi ematici presenti nell'innesto gradualmente si riduce e, dopo circa 14 giorni, il sistema vascolare dell'innesto appare normale. Anche l'epitelio gradualmente matura, formando uno strato di cheratina. La formazione e il mantenimento di una circolazione plasmatica tra innesto e sito ricevente durante la fase iniziale della guarigione rappresenta l'aspetto fondamentale per gli esiti di questa tipologia di interventi. Perciò, al fine di assicurare le condizioni ideali per la guarigione, bisogna eliminare, esercitando una pressione sull'innesto subito dopo la sutura, tutto il sangue che si viene a trovare tra l'innesto ed il sito ricevente.

1.4. LOW-LEVEL LASER THERAPY

1.4.1 Laser e medicina

La terapia laser a basso livello è stata usata per la guarigione delle ferite negli ultimi trent'anni. Inoltre viene ampiamente utilizzata in diverse branche della medicina rigenerativa e dell'odontoiatria, dove viene applicata per accelerare i processi di guarigione. In passato è stato dimostrato che la terapia laser a basso livello porta effetti benefici su una varietà di condizioni patologiche inclusi alleviamento del dolore e dell'infiammazione. Recentemente è stato riportato come la terapia laser a basso livello sia in grado di aumentare la proliferazione di cellule staminali cardiache e staminali. Anche se non sono pienamente compresi i meccanismi biologici alla base degli effetti biostimolatori della laser terapia a basso livello, diversi studi hanno riportato come la laser terapia a basso livello sia in grado di modulare i processi metabolici cellulari, portando ad un aumentato potenziale rigenerativo dei tessuti biologici. Gli effetti della laser terapia a basso livello sul metabolismo tissutale sono noti come "biostimolazione laser". Sono ben noti i positivi effetti biostimolatori della laser terapia sui tessuti. L'irradiazione della laser terapia a basso livello si riferisce all'utilizzo di laser a raggio rosso o vicino al rosso con una lunghezza d'onda di 600-1000 nm con una potenza da 1 a 500 mW. Questo tipo di radiazione è data da una luce pulsata o ad onda continua, consistente in un raggio costante a fluenza relativamente bassa ($0,04-50 \text{ J/cm}^2$), e il laser viene diretto sul tessuto bersaglio utilizzando potenze espresse in milliwatts (mW). La laser terapia a basso livello è in grado di prevenire l'apoptosi cellulare e stimolarne la proliferazione, la migrazione e l'adesione a bassi livelli di illuminazione con luce rossa o vicino al rosso. A dosi basse (2 J/cm^2), la laser terapia a basso livello stimola la proliferazione, mentre ad alte dosi (16 J/cm^2)

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

diventa soppressiva, secondo la dipendenza da dose delle risposte biologiche in seguito all'esposizione luminosa. Comunque, è stata dimostrata uno stimolo alla proliferazione cellulare anche al di fuori di questo range. È stato utilizzato un numero di diverse sorgenti laser, incluso il neon-elio, rubino, e il gallio-alluminio-arsenico, per la laser terapia a basso livello in diversi trattamenti e con diverse tempistiche. La laser terapia a basso livello trasmette energia a basso livello e quindi non emette calore, suono o vibrazioni, Le sue reazioni sono non-termiche poiché non avviene un immediato aumento nella temperatura del tessuto irradiato dal laser. Alcuni esperimenti sull'esposizione a laser terapia a basso livello hanno mostrato come l'aumento immediato di temperatura nel tessuto bersaglio fosse irrilevante ($\pm 1^\circ\text{C}$). Diversi studiosi hanno confermato come la temperatura rimanga inalterata all'interno di una sospensione di fibroblasti durante irradiazione laser a basso livello. In particolare, uno studio ha utilizzato una sonda microtermica in una coltura cellulare irradiata a 40 mW/cm^2 , riportando un aumento di temperatura di meno di $0,065^\circ\text{C}$. Al contrario, laser ad alta energia (ad es. laser al diossido di carbonio e laser Nd:YAG) sono in grado di alzare la temperatura di un tessuto abbastanza da poterlo tagliare e vaporizzare.

1.4.2 Meccanismi molecolari della proliferazione cellulare indotta dalla LLLT

La laser terapia a basso livello è in grado di stimolare un certo numero di processi biologici, inclusi crescita cellulare, proliferazione e differenziamento. Sono stati studiati gli effetti in vitro della laser terapia a basso livello sulla proliferazione cellulare di diverse popolazioni cellulari inclusi fibroblasti, cellule endoteliali, cellule scheletriche, cheratinociti, mioblasti, e altri. Non sono ancora chiari però i meccanismi molecolari associati agli effetti stimolatori della laser terapia a basso

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

livello. Un classico meccanismo consiste nell'assorbimento da parte di cromofori intracellulari dell'energia laser che viene convertita in energia metabolica, dato che i livelli cellulari di ATP aumento di quasi due volte in seguito a irradiazione con laser He-Ne. L'ATP agisce tramite sottotipi multipli di recettori nucleotidici P2 andando ad aumentare la concentrazione intracellulare di calcio (Ca^{2+}). Allo stesso tempo, l'ATP regola la sintesi proteica, la sintesi di DNA e l'espressione genica. Inoltre, uno studio ha dimostrato come l'ATP stimoli l'attivazione delle ERK1/ERK2 in un processo indipendente dalla chinasi PI3K, mentre la proliferazione cellulare richiede attività da parte sia delle ERK1/ERK2 che della PI3K. In molte tipologie cellulari, la cascata di segnali regolati dalle chinasi ERK gioca un ruolo molto importante nella proliferazione cellulare. L'attivazione indotta dalla ATP delle ERK1/ERK2 è dipendente dalla doppia specificità delle chinasi MEK, ma indipendente dall'attività della PI3K. La PI3K è una chinasi lipidica che promuove diverse funzioni biologiche inclusi proliferazione cellulare, sopravvivenza e motilità. La PI3K è un importante promotore della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, in particolare nelle cellule che rispondono all'attivazione di recettori dei fattori di crescita, in quanto le ERK sono uno dei maggiori regolatori della proliferazione cellulare. Per comprendere pienamente questo meccanismo, è necessario identificare i processi di trasduzione del segnale della proliferazione cellulare stimolata dalla laser terapia a basso livello. E' stato riportato come la laser terapia a basso livello attivi in modo specifico le vie MAPK/ERK e di conseguenza induca la proliferazione cellulare satellite. In un altro studio, è stato visto come la LLLT attivi le vie di segnale RTK/PKC in modo da promuovere la proliferazione cellulare e attivare significativamente le vie ROS/Src. Inoltre, la Akt può essere attivata sia dalle chinasi proteiche Src che PKCs. Di conseguenza, è verosimile che la AKT sia coinvolta nella proliferazione cellulare indotta da laser terapia a basso livello. D'altro canto, il trattamento laser a

basso livello è in grado di innalzare il livello intracellulare della formazione di ROS. L'aumento degli ossidanti intracellulari può mediare l'attivazione della Akt. Questo porta a suggerire l'esistenza di un meccanismo di segnali ROS/Akt durante la proliferazione indotta da laser terapia a basso livello.

1.4.3 Segnali cellulari in seguito a LLLT

La proliferazione cellulare rappresenta un effetto fisiologico molto importante nella laser terapia a basso livello, e viene utilizzata sia nelle procedure sperimentali di base su colture cellulari sia nella pratica clinica. La laser terapia a basso livello promuove la proliferazione di una gamma di popolazioni cellulari, principalmente attraverso l'attivazione delle catene respiratorie mitocondriali e l'avvio della segnalazione cellulare. Le alterazioni nella funzione dei fotorecettori rappresentano le reazioni primarie, mentre le conseguenti alterazioni dei segnali e delle funzioni cellulari rappresentano quelle secondarie. I meccanismi di proliferazione cellulare sono comunque scarsamente compresi. Sono stati proposti diversi meccanismi degli effetti mitogeni dell'irradiazione laser a basso livello, inclusa l'attivazione di specifici recettori che si trovano nel "giusto stato energetico" per accettare l'energia laser, portando ad una loro auto-fosforilazione e ad effetti "down-stream", e all'attivazione di canali del calcio portando ad un aumento della concentrazione intracellulare di calcio e alla proliferazione cellulare. L'irradiazione della luce rossa o infrarossa viene assorbita dai componenti della catena respiratoria mitocondriale, portando ad un aumento delle specie reattive all'ossigeno (ROS) e di adenosina tri-fosfato (ATP) o AMP ciclico, cominciando una cascata di segnali che promuove la proliferazione cellulare e la citoprotezione. In seguito all'aumento di ATP e di sintesi proteica dato dalla laser terapia a basso livello, avviene un aumento dei fattori di crescita e delle citochine

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

portando infine a proliferazione cellulare. La fototerapia si basa sugli effetti dell'energia luminosa sul metabolismo di sistemi viventi. Le risposte biologiche delle cellule a radiazioni visibili, infrarosse o vicine al rosso avvengono a causa di cambiamenti chimici e/o fisici a livello delle molecole dei fotorecettori, che sono componenti delle catene respiratorie. Alcuni dei cambiamenti più rilevanti indotti dall'irradiazione laser sulla cellula sono rappresentati da quelli a livello delle proprietà redox e nell'accelerazione dei trasferimenti degli elettroni, oltre che nel rilascio di ossido nitrico dai centri catalitici delle ossidasi e citocromo, nella generazione di superossidanti, nell'azione fotodinamica e nel cambiamento dell'attività biochimiche indotto dal riscaldamento locale transitorio dei cromofori.

1.4.4 Meccanismi di azione ed effetti biologici della LLLT

La stimolazione delle cellule mediante laser terapia a basso livello è stata esaminata in numerosi contesti. La laser terapia a basso livello stimola la guarigione delle ferite, la sintesi del collagene, la rigenerazione neurale, il rimodellamento e la riparazione avanzata del tessuto osseo, il recupero delle normali funzioni neurali in seguito a traumi, la normalizzazione di funzioni ormonali anormali, l'attenuazione del dolore, la stimolazione del rilascio di endorfine, e la modulazione del sistema immunitario. L'energia fotonica viene convertita in energia chimica all'interno della cellula sotto forma di ATP, portando ad una normalizzazione delle funzioni cellulari, attenuazione del dolore e guarigione. Viene alterata la permeabilità della membrana cellulare, seguita da cambiamenti fisiologici nelle cellule bersaglio. Gli effetti della laser terapia a basso livello sulla guarigione delle ferite sono spesso attribuite all'aumentata proliferazione cellulare. E' stato riportato come l'irradiazione delle cellule a certe lunghezze d'onda può attivare specifiche reazioni biochimiche così come può

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

alterare l'intero metabolismo cellulare. La laser terapia ha mostrato una varietà di effetti inclusi l'aumento del numero di cellule, della sintesi del DNA, e della produzione di collagene in diversi studi in vitro su fibroblasti umani in coltura. In un interessante studio, è stato visto come l'irradiazione laser è in grado di stimolare l'adesione cellulare ad un substrato di plastica. In uno studio è stato osservato come le culture irradiate da laser mostrino un innalzamento significativo del numero di fibroblasti dermici mani coltivati su un substrato di plastica, in confronto al rispettivo controllo non irradiato dopo 24 e 48 ore. E' stato anche riportato in letteratura come la stimolazione della proliferazione cellulare è dipendente dalla dose dell'irradiazione laser, poiché una dose bassa aumenta la velocità di proliferazione e di altre funzioni cellulari mentre alte dosi di laser terapia portano ad effetti negativi. Una possibile teoria riguardo i meccanismi d'azione della laser terapia a basso livello suggerisce come il laser sia in grado di influenzare i fotorecettori all'interno delle cellule. Questo meccanismo viene identificato come fotobiologia o biostimolazione. E' stato mostrato come la fotobiostimolazione avviene tramite la catene di trasporto enzimatica all'interno dei mitocondri, inducendo un forte tasso di respirazione cellulare da parte o delle porfirine endogene cellulari oppure da parte dei citocromi c, aumentando le funzioni ed il metabolismo cellulare. L'effetto biostimolatorio della laser terapia a basso livello porta ad un aumento della microcircolazione, maggior produzione nella sintesi di ATP, RNA ed DNA, andando a migliorare l'ossigenazione cellulare, la nutrizione, la rigenerazione e un aumento del sistema di trasporto mitocondriale degli elettroni. I fotoni entrano nella cellula e vengono prontamente assorbiti dai cromofori biologici localizzati nei mitocondri o nella membrana cellulare. Questi cromofori interagiscono in modo consistente con le irradiazioni laser. L'energia fotonica viene convertita in energia chimica all'interno della cellula sotto forma di ATP, che aumenta le funzioni cellulari e la velocità di

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

proliferazione cellulare. Viene alterata la permeabilità della membrana cellulare, seguita dai cambiamenti fisiologici a livello delle cellule bersaglio. La magnitudine dell'effetto biostimolatorio del laser dipende dalla lunghezza d'onda così come lo stato fisiologico delle cellule al momento dell'irradiazione. Per spiegare l'effetto biostimolatorio della laser terapia a basso livello, è stata proposta una catena di eventi molecolari partendo dall'assorbimento della luce da parte dei fotorecettori, passando alla fotoattivazione degli enzimi all'interno dei mitocondri, inclusi gli eventi di trasduzione ed amplificazione del segnale, e arrivando ad una fotorisposta. La luce viene assorbita dai componenti della catena respiratoria, portando a cambiamenti a livello sia del mitocondrio sia del citoplasma. A basse dosi, viene trasportata all'interno del citoplasma una quota addizionale di ioni Ca^{2+} mediante processi antiporta portando all'attivazione o alla stimolazione di diversi processi biologici quali sintesi di DNA e RNA, mitosi e proliferazione cellulare. Ad alte dosi, vengono rilasciati troppi ioni Ca^{2+} , portando ad una iperattività delle pompe calcio-ATP ed un esaurimento del bacino di ATP cellulare, inibendo quindi il metabolismo cellulare. La laser terapia a basso livello è stata applicata mediante luce visibile, infrarossa ed ultravioletta, ma i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando lo spettro visibile con un range da 600 a 700 nm. In diversi studi in vitro è stato osservato come la luce laser a 860 nm stimoli la proliferazione cellulare, quella a 812 nm aumenti la sintesi di DNA, quella a 660 nm aumenti la produzione dei fattori di crescita basici dei fibroblasti, e quella a 632,8 nm utilizzata su culture di cheratinociti aumenti la proliferazione cellulare, stimoli il rilascio di IL-1 e IL-8 e aumenti la velocità nella motilità. I macrofagi vengono attivati dalla luce laser a 632,8 nm, e diverse lunghezze d'onda sono in grado di aumentare la secrezione di fattori di crescita da parte di colture di macrofagi. E' stato anche descritto un aumento in vitro della proliferazione delle cellule endoteliali vascolari in seguito a laser terapia a basso livello. E' stato riportato

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

come a livello di colture di fibroblasti, la velocità di proliferazione ha un picco in presenza di luce a 665 nm e 675 nm, mentre viene inibita con la luce a 810 nm. E' intuibile quindi come non tutti gli studi sulla laser terapia a basso livello ne riconoscano l'efficacia. In uno studio, l'irradiazione laser a bassa intensità mediante laser gallio-alluminio-arsenurio ha fallito nell'aumentare la proliferazione, la migrazione o l'adesione di cheratinociti o fibroblasti in coltura. Inoltre diversi autori hanno riportato come la biostimolazione in vitro dipenda da diversi fattori, inclusi i parametri laser come la lunghezza d'onda, la fluenza, la potenza e il tipo di cellule irradiate. I parametri che possono avere effetti positivi sul tasso di proliferazione possono a volte averne di avversi sulla sintesi proteica. Perciò rimane di cruciale importanza conoscere la corretta combinazione dei parametri (ad esempio lunghezza d'onda, densità di energia e potenza) per ottenere il massimo tasso di proliferazione cellulare. E' stato dimostrato come gli effetti della laser terapia dipendano dalla radiazione, dalla lunghezza d'onda, dalla dose e dall'intensità così come dalle diverse condizioni delle colture cellulari, Per questo motivo, è possibile che le cellule nei tessuti o nelle colture non rispondano alla laser terapia a basso livello esattamente allo stesso modo, e che parametri simili possano dare effetti diversi su differenti colture cellulari. La laser terapia, emessa a basse dosi, può produrre un miglior risultato se paragonata a quella emessa ad alte dosi con la medesima lunghezza d'onda; questo fenomeno viene definito col termine "risposta bifasica alla dose" o "ormesi". E' stata dimostrata diverse volte una risposta bifasica alla dose da parte di molti autori che hanno studiato la laser terapia a basso livello, e per descrivere questi effetti dose-dipendenti è stato spesso preso come modello la "legge di Arnst-Schulz". Secondo questa legge, stimoli deboli possono accelerare leggermente le attività vitali mentre stimoli più forti le aumentano ulteriormente; ma quando viene raggiunto il picco, stimoli più forti ne causano la soppressione, fino ad ottenere una risposta negativa. Una curva bifasica

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

può essere utilizzata per visualizzare la risposta attesa alla dose di luce a livelli sottocellulari, cellulari, tissutali o clinici. La curva bifasica può essere di aiuto per identificare il livello di energia sufficiente da applicare per ottenere la massima biostimolazione. Se viene applicata una quantità insufficiente di energia non si otterrà alcuna risposta (poiché non si è raggiunto il valore soglia minimo). Se viene applicata troppa energia, viene superata invece la soglia massima passando quindi da una biostimolazione ad una bioinibizione. E' stato riportato come i risultati della laser terapia a basso livello possono essere influenzati variando l'irradiazione ed il tempo di esposizione, mantenendo una fluenza costante.

1.4.5 Applicazione della LLLT su colture cellulari

Esistono in letteratura diversi studi che investigano gli effetti stimolanti dell'irradiazione laser a bassa energia su fibroblasti umani gengivali; in alcuni studi è stato riportato un aumento della crescita cellulare e della sintesi del procollagene con l'utilizzo di laser a diodi Ga-As^{48,49} a 2, 3 e 4 J/cm²; altri hanno riportato una diminuzione della crescita cellulare in seguito a trattamento con laser a diodi⁵⁰ con una potenza variabile da 0,5 a 2,5 W, e Nd:YAG⁵¹ con potenza da 1 a 3 W. Uno studio di Pourzarandian⁵² ha mostrato l'effetto in vitro del laser Er:YAG con una fluenza variabile da 1,68 a 5 J/cm² su colture di fibroblasti gengivali umani, riportando un aumento della proliferazione cellulare e la stimolazione della fase attiva secretoria ad una certa densità di energia, senza alcun effetto tossico causato dalle interazioni termiche. In alcuni studi su colture di cheratinociti, Grossman⁵³ ha osservato un aumento significativo della proliferazione cellulare in seguito a irradiazione mediante laser a diodi con fluenza da 0,45 a 0,95 J/cm², mentre Pogrel⁵⁴ non è stato in grado di ottenere un aumento di proliferazione, adesione o migrazione in seguito a trattamento con laser a diodi GaAlAs con

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

potenza variabile da 5 a 100 milliwatts. Schartinger⁵⁵ ha valutato l'irradiazione laser a basso livello tramite laser a diodi con fluenza da 0,39 a 63,7 mW/cm², osservando un aumento delle colture di fibroblasti rispetto ai controlli. Chellini⁵⁶, valutando l'effetto dell'irradiazione con laser Nd:YAG a bassa energia (20mJ), non ha osservato un aumento della proliferazione dei fibroblasti posti in coltura. Skinner⁵⁷ ha utilizzato un laser Ga-As con una fluenza variabile da 0 a 1 J/cm² per irradiare colture di cellule fibroblastiche, osservando un aumento nella produzione di collagene e la massima biostimolazione con dosi da 0,099 a 0,522 J/cm². Questi risultati discordanti sono dovuti a diversi parametri quali una potenza di emissione adeguata, il tempo di esposizione, la lunghezza d'onda e la distanza dal bersaglio. Diversi autori hanno investigato l'effetto della LLLT su colture di cheratinociti: Pogrel⁵⁴ non è riuscito ad osservare un effetto biostimolatorio in termini di adesione, proliferazione o migrazione sulle colture irradiate da laser a diodi con potenza da 5 a 100 mW. Grossman⁵⁸ ha riportato un aumento nella proliferazione dei cheratinociti di 1,3-1.9 volte rispetto ai controlli mediante irradiazione con laser a diodi con fluenza di 0,45-0,95 J/cm. Haas⁵⁹ ha indagato l'effetto dell'irradiazione mediante laser HeNe su cheratinociti riportando una modesta attivazione del fattore NF-KB. Yu⁶⁰ invece ha riportato un aumento nella produzione di citochine direttamente proporzionale all'aumento della fluenza del laser HeNe utilizzato per irradiare i cheratinociti.

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO
CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

Autore (anno)	Tipo di studio	Tipo Laser	Lunghezza d'onda	Distanza	Punto focale	Potenza	Tempo	Fluenza	Nr. Applicaz.	Miglior risultato
Pogrel (1997)⁵⁴	Proliferazione, adesione e migrazione in monoculture krt-fbr	Diodi	830 nm	1,1 cm	0,14 cm ²	5-100mW	10-120 sec	0,12-4,24 J/cm ²	1	> prolif. a 1,41 J/cm ² , > ades. a 0,71, > migraz. a 1,41
Grossman (1998)⁵³	proliferazione in colture krt	Diodi	780 nm CW	2 cm	0,32 cm ²	6,5 mW	0-180 sec	0-3,6 J/cm ²	1-2-3	0,42-0,55 J/cm ² . Più applicaz. Non migliorano.
Pourzarandian (2005)⁵²	vitalità fbr gengivali	Er:Yag	2,94 µm	15 cm	0,01 cm ²	30-350 mJ	?	1,68-5 J/cm ²	1	3,37 J/cm ²
Chiu (2005)⁶¹	Laser su krt-fbr	Diodo	635 nm	?	0,003 cm ²	?	?	5-10-20 J/cm ²	1	Stessa vitalità cell. del ctr con 5 J/cm ²
Haas (1998)⁵⁹	Laser su krt	HeNe	?	?	?	?	?	15 J/cm ²	1	Modesta traslocazione del fattore NK-kB
Kreisler (2001)⁵⁰	Laser su fbr	Diodi GaAlAs	810 nm CW	0,5 mm	0,0003 cm ²	0,5-2,5 W	1 applicazione	25-493 J/cm ²	1	> vitalità 1 W per 60 secondi
Skinner (1996)⁵⁷	Laser su fbr	Diodo GaAs	904 nm	3 mm	0,33 cm ²	2,5-3,2-4,2 mW	10-20-40-80 sec ogni 24 o 48 ore	0,099-0,522 J/cm ²	1 0 2 al giorno per 4 giorni.	> prod. Collag. max 0,522 J/cm ² 1 app per 4 gg

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO
CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

Autore (anno)	Tipo di studio	Tipo Laser	Lunghezza a d'onda	Distanza	Punto focale	Potenza	Tempo	Fluenza	Nr. Applicazioni	Miglior risultato
Almeida-Lopes (2001)⁴⁸	Proliferaz. di fbr gengivali umani	Diodi	670,780,692,786 nm	?	0,01 cm ²	10 (670), 50 (780), 30 (692 e 786) mW	?	2 J/cm ²	1	Miglior risultato con 780 ma sempre prolifer.
Azevedo (2006)⁶²	Crescita fbr geng. umani	Diodi	660 nm	A contatto	0,07 cm ²	10 e 29 mW	14 e 4,8 sec	2 J/cm ²	1	> crescita con 10 mW
Kreisler (2002)⁶³	Proliferazione e fbr geng. umani	Diodi	809 nm	9 mm	?	10 mW	75, 150 e 300 sec	1,96 – 3,92 – 7,84 J/cm ²	1, 2 o 3 (ogni 24 ore)	Prolif. > con irradiazioni ripetute
Marques (2004)⁶⁴	Sintesi proteica e morfologia su fbr geng. umani	Diodi	904 nm	2 mm	0,07 cm ²	120 mW	24 sec	3 J/cm ²	1	Riduz. proteine, alterazione struttura cellul. (probabile apoptosi).
Pereira (2002)⁴⁹	Crescita e sintesi pro collagene fbr(NIH 3T3)	Diodi	904 nm	2 mm	0,07 cm ²	120 mW	8 - 16 e 24 sec.	1 - 2 - 3 J/cm ²	2 ogni 6 ore	Crescita e no inibizione pro collagene con 8 sec a 1 J + 16 sec a 2 J
Yu (1996)⁶⁰	Produzione citochine su cheratinociti umani	He-Ne	?	17 cm	?	7 mW	?	0 – 0,5 – 1- 1,5 J/cm ²	1	> produzione citochine aumentando fluenza.

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO
CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

Autore (anno)	Tipo di studio	Tipo Laser	Lunghezza d'onda	Distanza	Punto focale	Potenza	Tempo	Fluenza	Nr. Applicazioni	Miglior risultato
Vinck (2003)⁶⁵	Prolif. fbr da pollo	Diodi	830 nm	0,6 cm	0,196 cm ²	40 mW	5 sec	1 J/cm ²	1 al gg x 3 gg	Aumento proliferazione
Chen (2000)⁵¹	Vitalità fbr gengivali	Nd:Y AG	1,064 nm	a contatto	400 μm	?	10 sec	10 - 200 mJ	1	Diminuzione vitalità fbr di 14-44%

Tab. 1 Review dei principali studi sulla LLLT su cellule presenti nei tessuti del cavo orale

1.5 RIPRODUZIONE IN VITRO DEL TESSUTO EPITELIALE

L'isolamento e la coltura di svariate tipologie cellulari mantenute nelle loro normali funzioni sono processi ampiamente sviluppati. I cheratinociti, ad esempio, possono essere isolati dall'epidermide o da altri epiteli squamosi provenienti da umani e roditori, e cresciuti in monostrati in un terreno di crescita privo di siero, ad esempio l'MCDB153, e indotti al differenziamento da parte di svariati agenti come Ca^{2+} e la vitamina D_3 . Le colture monostrato sono utili in quanto permettono lo studio di popolazioni cellulari sotto condizioni definite. Le condizioni delle colture monostrato differiscono però da quelle in vivo, dove esiste una regolazione omeostatica della crescita cellulare e un differenziamento sotto una rigida organizzazione architettonica. Nell'epidermide in vivo, i cheratinociti formano un foglio di epidermide suddiviso in strati sequenzialmente stratificati partendo dalle cellule basali in crescita fino a terminare in uno strato cornificato differenziato. La superficie dell'epidermide è esposta all'aria mentre sul fondo i cheratinociti interagiscono col derma tramite la membrana basale. Per consentire un approccio a queste condizioni in vivo, sono state sviluppate le colture organotipiche di epidermide umana. All'interno di questo sistema, i cheratinociti sono stati coltivati su un'interfaccia aria-liquido sulla superficie di un gel collagene contenente fibroblasti. I cheratinociti si stratificano ed esibiscono un tipico pattern di epitelio squamoso differenziato, generando un modello vivente di epidermide⁴¹.

La continua produzione di uno strato corneo nel livello finale del processo di differenziamento epiteliale coinvolge espressioni geniche regolate a livello dei cheratinociti bilanciate con la proliferazione cellulare, mantenendo quindi l'omeostasi tissutale. Le condizioni patologiche dell'epitelio portano a disturbi in

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

questo stato di equilibrio, inducibili anche da potenti agenti farmacologici, come la vitamina A, D e il TGF β . Il mantenimento fisiologico dell'omeostasi richiede un funzionamento adeguato dei meccanismi di controllo regolati dalle interazioni epitelio-mesenchima e mediate dai fattori di diffusione. Per poter studiare i meccanismi di regolazione in vitro, mantenendo i principi della biologia dell'epitelio, sono state sviluppate delle coculture organotipiche tridimensionali. Queste condizioni, mimando l'architettura tissutale naturale mantenendo una forma semplificata, permettono ai cheratinociti di riprodurre in vitro il loro programma di differenziamento tissutale. Grazie a queste coculture è stato possibile studiare la funzione dei fattori di diffusione che mediano le interazioni epitelio-mesenchima e le dinamiche di formazione della membrana basale. Inoltre sono diventati accessibili diversi aspetti della biologia epiteliale dipendenti dal differenziamento cheratinocitico, ad esempio come l'epitelizzazione nella guarigione delle ferite, la relazione nella proliferazione e nel pattern delle integrine, l'espressione dei promotori del papilloma virus umano, e lo sviluppo della barriera dello strato corneo. Le co-culture organotipiche si sono inoltre dimostrate dei sistemi affidabili per testare gli effetti dei modulatori per il differenziamento, la crescita così come i fattori nutritivi. Oltre al loro ruolo nella ricerca di base sulla biologia epidermica, gli equivalenti di epidermide in coltura sono strumenti validi per test farmacologici e tossicologici in vitro come alternative ai modelli animali e per utilizzo terapeutico come sostituti epidermici (ad esempio copertura di ferite e terapia genica). In tutti questi campi di applicazione, è indispensabile una standardizzazione del sistema in vitro⁶⁶.

1.5.1 Co-culture di mucosa orale

La mucosa orale umana è ricoperta da un epitelio squamoso stratificato che mostra variazioni regionali marcate nel pattern di maturazione. All'interno della bocca è presente mucosa ortocheratinizzata, paracheratinizzata e non cheratinizzata, ed esistono prove consistenti su come questi pattern regionali vengono mantenuti nella vita post-embrionale da continue influenze induttive da parte del tessuto connettivo. Malgrado numerosi tentativi per definire questi fattori di influenza, le loro origini e le loro basi molecolari rimangono sconosciuti. La metodica più frequentemente utilizzata per analizzare le interazioni epitelio-mesenchimali nei tessuti adulti è rappresentata da innesti ricombinanti di epitelio dissociato e tessuto connettivo proveniente da diversi siti. Il razionale dietro questo approccio risiede nel fatto che i cambiamenti nel pattern di differenziazione epiteliale possono essere indotte da stimoli provenienti dal tessuto connettivo innestato. Comunque, esistono difficoltà con questo approccio riguardo l'isolamento del tessuto connettivo sottoepiteliale privo di residui epiteliali, una condizione senza la quale non è possibile essere certi dell'origine del tessuto epiteliale neoformato in seguito all'innesto⁶⁷. Lo sviluppo ed il mantenimento del tessuto epiteliale deriva da complesse interazioni fra l'epitelio ed il mesenchima sottostante. Specifiche interazioni epitelio-mesenchima sono critiche per una corretta proliferazione e differenziamento e sono quindi essenziali per la preservazione del fenotipo epiteliale. Gli strumenti sperimentali per lo studio delle molecole che contribuiscono al fenotipo epiteliale in vivo usano sistemi cellulari interattivi basati su co-culture organotipiche o xenotrapianti. Nelle colture organotipiche, utilizzando collagene tipo 1, il partner mesenchimale dei cheratinociti viene limitato ad una sola tipologia cellulare, ad esempio fibroblasti provenienti da tessuto connettivo oppure cellule endoteliali. In caso di xenotrapianti, i

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

cheratinociti vengono supportati da un completo mesenchima. Nelle co-culture organotipiche, i cheratinociti ed i fibroblasti mesenchimali crescono separati da una matrice di collagene, che mimica la situazione in vivo. Basandosi su questo allestimento cellulare, i cheratinociti formano in vitro un epitelio stratificato, sollecitando quindi il loro comportamento di crescita in contrasto alle monoculture convenzionali o alle colture di sostegno con fibroblasti irradiati. Le co-culture organotipiche sono state utilizzate per studiare le proprietà di crescita di cheratinociti primari o immortalizzati raccolti da diversi siti corporei, quali l'epidermide, la mucosa orale buccale, e la gengiva. L'integrità dell'epitelio stratificato, come l'epitelio gengivale, richiede l'espressione di particolari molecole: marker precoci e tardivi, come particolari cheratine, l'involucrina che costituisce l'involucro corneificato, la filaggrina, le integrine, i mediatori dell'adesione e della matrice extracellulare, i componenti della sintesi della matrice extracellulare, e riguardo all'epitelio, componenti della matrice extracellulare inclusi collagene tipo IV, laminina 1/10 e laminina 5, che formano la membrana basale.⁶⁸

1.5.2 Espressione della cheratina nei tessuti epiteliali

Tutte le cellule dei tessuti di mammiferi contengono un complesso citoscheletro intracitoplasmatico composto da tre unità strutturali principali associate a delle proteine: microfilamenti contenenti actina, microtubuli contenenti tubulina, ed i filamenti intermedi. Esistono sei distinti tipi di filamenti intermedi: i filamenti di cheratina costituiscono i filamenti intermedi di tipo I e tipo II. Paragonate agli altri tipi di filamenti intermedi, come ad esempio la desmina, la vimentina, la proteina fibrillare acida della glia (GFAP), e i neurofilamenti, le cheratine sono le più complesse. In base al peso molecolare, le cheratine possono essere suddivise in

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

forme ad alto o basso peso, e suddivise in forme basiche o acide in base al punto isolettrico. In generale, la maggior parte delle cheratine a basso peso molecolare si accoppiano a cheratine ad alto peso molecolare; e la maggior parte delle cheratine basiche si accoppiano con quelle acide, come definito dalla coespressione. Non tutte le cheratine vengono sintetizzate simultaneamente da ogni cellule; in genere, differenti sottoset di cheratine vengono espresse durante il corso del differenziamento terminale, nelle differenti fasi di sviluppo, così come in differenti epiteli. Per questo motivo, tutti i tessuti epiteliali (semplici e complessi) possono essere classificati in base all'espressione della cheratina citoscheletrica. I geni che codificano le cheratine rappresentano una delle più larghe famiglie multigeniche, comprendenti almeno 30 geni codificanti i polipeptidi della cheratina. Le cheratine tipo I e II hanno in genere nove esoni e otto introni, ad eccezione della K8 che non ha l'introne V. Il numero e la posizione degli introni, ma non la sequenze o la lunghezza degli introni stessi, vengono in genere preservati. La posizione degli introni nei geni della cheratina varia leggermente. Le cheratine acidiche tipo I (K9-K20), più piccole, vengono codificate dal cromosoma 17q, mentre le cheratine basiche tipo II (K1-K8), più grandi, sono codificate dal cromosoma 2q. La maggior parte dei geni per la cheratina caratterizzati finora sembra esista come singola copia per genoma aploide, con l'eccezione della K6. In letteratura è stato riportato uno pseudogene per la cheratina umana 14. L'espressione genica della cheratina viene regolata in maniera specifica verso il differenziamento e verso il tipo di tessuto, creando dei pattern che vengono ben conservati tra le specie mammifere. È tipica l'espressione relativa di cheratine larghe e leggermente basiche in molti epiteli stratificati. Le K1 e K2 sono state descritte all'interno dell'epidermide cheratinizzata di diversi siti corporei così come nell'epitelio del canale anale e della ectocervice. L'accoppiamento di K1 e K2 con K9-K11 (cheratine relativamente larghe o intermedie e acidiche) viene ritrovato

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

esclusivamente nell'epidermide. Di queste, la K) è particolarmente prominente nell'epidermide della pianta del piede. L'espressione delle K3 (larga e basica) e K12 (acidica e intermedia) viene esclusivamente osservata nella cornea. Le cheratine K4-6 (larghe e basiche), K13 (intermedie e acidiche), e K14-17 (piccole ed acidiche) sono espresse all'interno dell'epitelio squamoso stratificato non cheratinizzato, inclusi la mucosa squamosa (bocca, esofago e cellule basali). Le K6 tipo II sono rilevabili in base a diversi criteri. A differenza di molte altre cheratine, l'espressione accoppiata di K6 alle K16 e/o K17 non è collegata con un programma ben definito di differenziamento terminale. Al contrario, K6 viene espressa costitutivamente in particolari tipi di epitelio, come ad esempio le papille filiforme della lingua, l'epitelio stratificato di confine fra la mucosa orale e l'esofago, l'involucro esterno dei follicoli del capello, e nell'epitelio delle ghiandole. Con l'eccezione di specifici siti corporei, ad esempio le piante ed i palmi, la K6 non viene espressa nell'epidermide a meno che non si sia sottoposta a iperplasia o differenziamento anormale. Le K5 e K14 costituiscono il network di cheratina nelle cellule basali, e rappresentano più del 10% delle proteine cellulari. Nel momento in cui le cellule escono dallo strato basale, cambiano la trascrizione dei geni per K5 e K14 con quella dei geni per K1 e K10. L'espressione delle cheratine nei follicoli capilliferi è complessa: l'involucro della radice interna esprime K1 e K10: l'involucro esterno esprime K5, K14, K6, K16 e K17; la ghiandola sebacea associata esprime K5 e K14. In più K5 e K14 vengono espresse in un certo numero di epitelii squamosi non stratificati, inclusi le cellule mioepiteliali del seno., le ghiandole salivari e sudoripare, i corpuscoli di Hassall del timo, e nelle ghiandole paratiroidi. Le K7 e K8 (intermedie e basiche) e K18 e K19 (più piccole e acidiche) sono esclusivamente espresse in quasi la totalità degli epitelii semplici, negli epitelii respiratori pseudostratificati, e negli epitelii di transizione. K8 e K18 si accoppiano e hanno distribuzione simile. L'espressione

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

della K19 viene ritrovata in una larga gamma di tessuti epiteliali, inclusi molti epiteli semplici, diversi epiteli complessi e i cheratinociti in coltura. La K19 non viene rilevata in epatociti o nell'epidermide e tessuti relativi. La K20 (intermedia e acidica) viene espressa nell'epitelio gastrico, nei villi intestinali e nell'epitelio criptico, cutaneo e nelle cellule orali di Merkel, nelle papille gustative della bocca, e nelle cellule a ombrello dell'epitelio transizionale. Ka K20 è anche presente sin piccoli sottostrati di cellule epiteliali all'interno della ghiandola prostatica normale e in altri organi ghiandolari. La K20 è in sostanza assente nella pelle, nel seno, nell'epitelio respiratorio, nelle ghiandole salivari, nel fegato o in cellule non-epiteliali. Il normale tessuto molle di derivazione mesenchimale raramente esprime cheratina. Esistono comunque delle eccezioni. Le mucose fetali muscolari e la muscolatura propria esprimono fortemente K8/K18. Al contrario, la muscolatura liscia adulta del vaso sanguigno ed il miometrio uterino mostrano una positività variabile alle K8/K18. Il più delle volte, la colorazione rimane negativa, ma occasionalmente è possibile osservare singoli punti paranucleari di immunoreattività o colorazioni vagamente diffuse. Le cellule epiteliali vascolari sono cellule specializzate derivate dal mesenchima. Le normali cellule endoteliali sono positive alla K1, mentre l'endotelio di vene, venule e del linfatico sono in genere positive alla K7 e K18.⁶⁹

2. FASE SPERIMENTALE

2.1 SCOPO DELLA RICERCA

L'insieme delle tecniche proposte in letteratura per l'aumento di tessuto gengivale cheratinizzato non prescinde dalla componente chirurgica del trattamento. I lembi riposizionati, combinati o meno a innesti liberi, comportano la programmazione di una o più fasi chirurgiche con i conseguenti disagi post-operatori ed i risultati non sempre predicibili. L'introduzione negli ultimi anni della laser terapia a basso livello ha permesso un approccio meno invasivo in particolare nel trattamento dei pazienti parodontalmente compromessi, limitando la componente chirurgica del trattamento ai casi di grave compromissione dal punto di vista anatomico dei tessuti di sostegno, ricorrendo a tecniche rigenerative. Scopo di questo studio in vitro è di investigare e stabilire l'efficacia della biostimolazione laser per lo sviluppo dello strato cheratinizzato del tessuto epiteliale a partire da co-culture fibroblasti-cheratinociti ottenute da linee cellulari primarie e da mono-culture di fibroblasti e cheratinociti. Inoltre si investiga l'effetto della laser terapia a basso livello applicata utilizzando un nuovo tipo di manipolo su colture e co-culture di cellule adulte, specificamente progettato per l'irradiazione laser a dosi alte in paragone a quelle suggerite ed utilizzate negli studi presenti in letteratura internazionale; si vuole infatti valutare se con l'utilizzo di questo manipolo l'applicazione di alte dosi di energia laser ripetuta nel tempo possa provocare gravi effetti inibitori o di apoptosi sulle cellule irradiate.

2.2 MATERIALI E METODI

2.2.1 Preparazione delle colture cellulari

E' stato acquistato un kit di linee cellulari primarie basali cheratinociti-fibroblasti (Matched Set-Cryopreserved Dermal Fibroblasts and Keratinocytes, Tebu-bio™) ottenute da tessuto epidermico umano, conservate in due vial separati. Le cellule sono state scongelate e poste in coltura nel loro terreno di crescita.

I cheratinociti sono stati posti in un terreno (Human Adult Keratinocyte Growth Medium KM-2, Tebu-bio™) composto da medium MCDB153 supplementato da:

- Fattore di crescita epidermico (rEGF)
- Insulina
- Transferrina
- Albumina di siero bovino
- Etanolamina
- Fosfoetanolamina
- Idrocortisone
- Cloruro di calcio
- Epinefrina
- Estratto di pituitaria bovina (BPE)
- Penicillina
- Streptomicina
- Amfotericina B

Sono state rimosse le cellule dall'azoto liquido e posizionate immediatamente in un bagno d'acqua a 37°C. Sono poi state trasferite in una provetta a fondo conico sterile per centrifuga contenente 9 ml di medium di crescita, e centrifugate a

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

300xg, 20°C per 5 minuti. È stato aspirato il medium e sono state risospese le cellule in un volume di medium di crescita appropriato per un conteggio cellulare.

Le cellule sono state seminate a una densità di $0,37-0,75 \times 10^6$ cellule per ogni beuta da coltura ($5000-10000 \text{ cell/cm}^2$) in 20 ml di medium. Il tutto è stato incubato a 37°C in incubatore umidificato con 5% CO₂. Il medium è stato sostituito a 24 ore dall'allestimento della coltura, e sostituito il medium ogni 2-3 giorni fino ad ottenere una confluenza del 70-80% (circa 5-6 giorni).

Sono stati preriscaldati in un bagno di acqua il medium di crescita, la soluzione 25% tripsina / 2,21mM EDTA e il tampone fosfato salino (PBS) sterile senza Ca²⁺/Mg²⁺. È stato aspirato il medium e risciacquate le cellule 2-3 volte in PBS per rimuovere ogni traccia di medium. È stato poi rimosso il PBS e aggiunto 2 ml di soluzione tripsina/EDTA preriscaldata. Sono state poi incubate le cellule a 37°C, controllando il distacco delle cellule sotto microscopio dopo 2 minuti. Una volta neutralizzata la tripsina usando un volume equivalente di 0,5 mg/ml di inibitore di tripsina, sono state collezionate le cellule in provette coniche contenenti 4 ml di medium di crescita., e centrifugate a 300xg per 5 minuti a 20°C. E' stato aspirato il medium e risospese le cellule nel medium di crescita per procedere al conteggio.

Sono poi state seminate le cellule a $5000-10000 \text{ cell/cm}^2$ in 20 ml di medium di crescita, e posizionate le colture in incubatore umidificato a 37°C con 5% CO₂, assicurandosi che la superficie sia livellata da permettere una distribuzione omogenea delle cellule. Il medium è stato sostituito dopo 24 ore, quindi ogni 2-3 giorni fino al 70-80% della confluenza (Fig. 1,2,3).

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL
DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**



Fig. 1 Fotografia 10x di cheratinociti in coltura

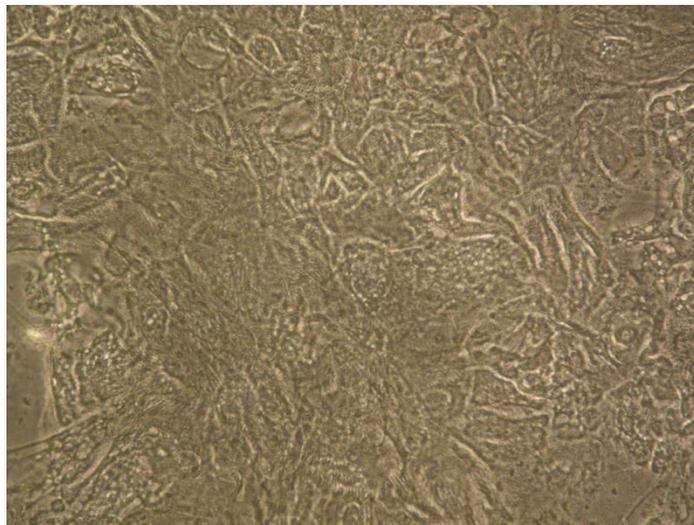


Fig. 2 Fotografia 20x di cheratinociti in coltura

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

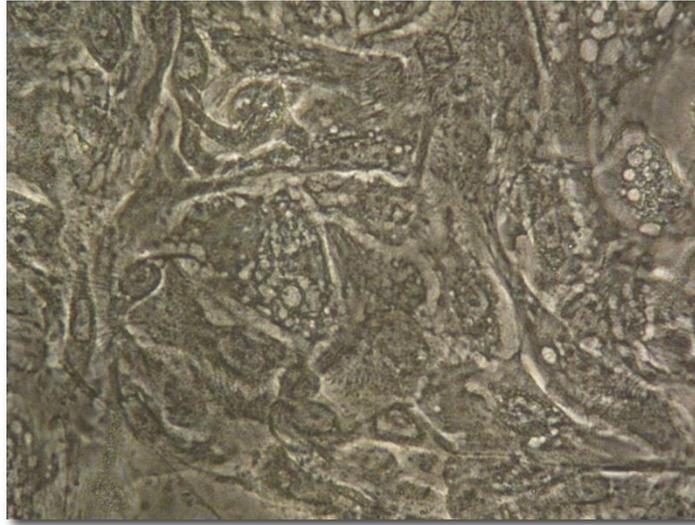


Fig. 3 Fotografia 40x di cheratinociti in coltura

I fibroblasti sono stati posti in un terreno (EurocloneTM) composto da DMEM (4,15 g/L di D-glucosio) supplementato da:

- Siero bovino fetale (FBS) al 10%
- Penicillina
- Streptomicina
- Amfotericina B

Sono state rimosse le cellule dall'azoto liquido e posizionate immediatamente in un bagno d'acqua a 37°C. Sono poi state trasferite in una provetta a fondo conico sterile per centrifuga contenente 9 ml di medium di crescita, e centrifugate a 300xg, 20°C per 5 minuti. È stato aspirato il medium e sono state risospese le cellule in un volume di medium di crescita appropriato per un conteggio cellulare.

Le cellule sono state seminate a una densità di $0,37-0,75 \times 10^6$ cellule per ogni beuta da coltura ($5000-10000 \text{ cell/cm}^2$) in 20 ml di medium. Il tutto è stato incubato a 37°C in incubatore umidificato con 5% CO₂. Il medium è stato sostituito a 24 ore dall'allestimento della coltura, e sostituito il medium ogni 2-3

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

giorni fino ad ottenere una confluenza del 70-80% (circa 5-6 giorni). Sono stati preriscaldati in un bagno di acqua il medium di crescita, la soluzione 25% tripsina / 2,21mM EDTA e il tampone fosfato salino (PBS) sterile senza Ca^{2+}/Mg^{2+} . È stato aspirato il medium e risciacquate le cellule 2-3 volte in PBS per rimuovere ogni traccia di medium. È stato poi rimosso il PBS e aggiunto 2 ml di soluzione tripsina/EDTA preriscaldata. Sono state poi incubate le cellule a 37°C, controllando il distacco delle cellule sotto microscopio dopo 2 minuti. Una volta neutralizzata la tripsina usando un volume equivalente di 0,5 mg/ml di inibitore di tripsina, sono state collezionate le cellule in provette coniche contenenti 4 ml di medium di crescita., e centrifugate a 300xg per 5 minuti a 20°C. E' stato aspirato il medium e risospese le cellule nel medium di crescita per procedere al conteggio. Sono poi state seminate le cellule a 5000-10000 cell/cm² in 20 ml di medium di crescita, e posizionate le colture in incubatore umidificato a 37°C con 5% CO₂, assicurandosi che la superficie sia livellata da permettere una distribuzione omogenea delle cellule. Il medium è stato sostituito dopo 24 ore, quindi ogni 2-3 giorni fino al 70-80% della confluenza (Fig. 4,5,6).

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL
DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**



Fig. 4 Fotografia 10x di fibroblasti in coltura



Fig. 5 Fotografia 20x di fibroblasti in coltura

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO



Fig. 6 Fotografia 40x di fibroblasti in coltura

Sono state eseguite delle prove sul tipo di terreno da utilizzare per l'allestimento delle co-culture fibroblasti-cheratinociti in modo da ottenere le condizioni di crescita più stabili per entrambe le popolazioni cellulari. Inizialmente è stato utilizzato unicamente il terreno di crescita dei cheratinociti, che ha causato una forte sofferenza dei fibroblasti nel giro di pochi giorni, presumibilmente a causa della mancanza di siero bovino nel terreno. Sono stati poi testati un terreno composto dal medium di crescita dei cheratinociti addizionato del 10% di siero bovino, uno composto dal medium dei cheratinociti con il siero bovino al 5% e un terreno composto in proporzione 1:1 dal terreno dei cheratinociti e quello dei fibroblasti raggiungendo quindi una concentrazione del siero bovino del 5%. Quest'ultimo terreno ha dimostrato di essere in grado di mantenere le migliori condizioni di vitalità sia per quanto riguarda i fibroblasti sia per i cheratinociti. Le co-culture fibroblasti-cheratinociti sono state ottenute tripsinizzando per 5 minuti a 37°C con 2 ml di tripsina 0,05%-EDTA 0,02% i cheratinociti, centrifugati in 1 vol. di FCS a 1000 rpm per 7 minuti, scartando il surnatante.

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL
DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

È stato tolto il medium di coltura dei fibroblasti e posto 1 ml di terreno per le coculture. I cheratinociti sono stati insemiati sopra alle colture di fibroblasti e posti nell'interfaccia aria-liquido. Il terreno di crescita è stato sostituito ogni 2 giorni di coltura (Fig. 7,8,9).

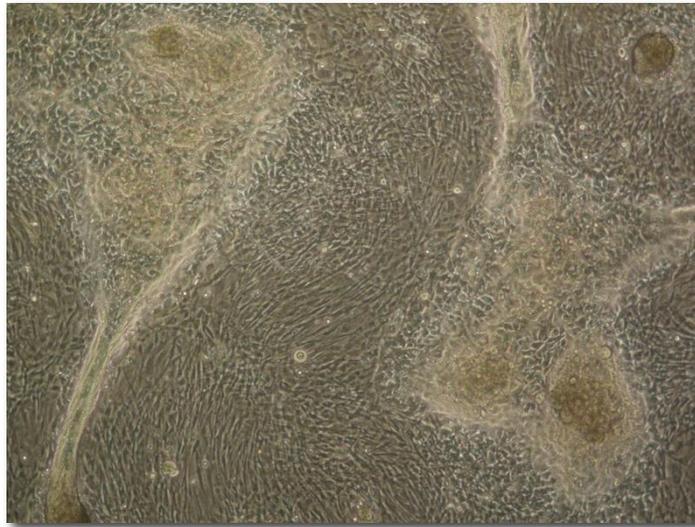


Fig. 7 Fotografia 10x di co-cultura fibroblasti-cheratinociti

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL
DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

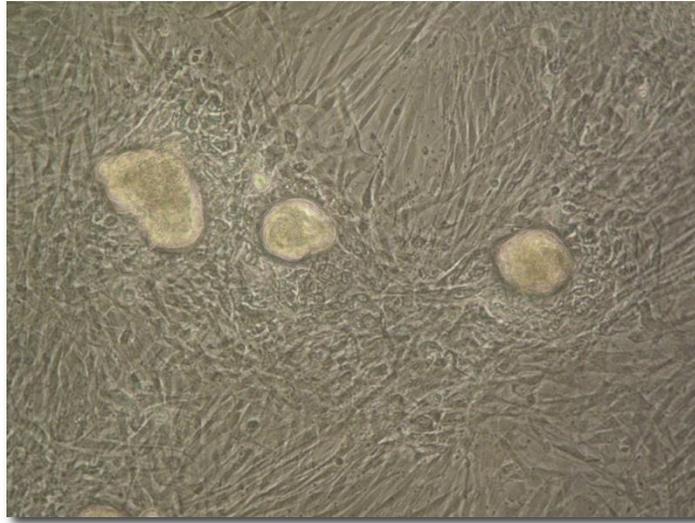


Fig. 8 Fotografia 20x di co-coltura fibroblasti-cheratinociti

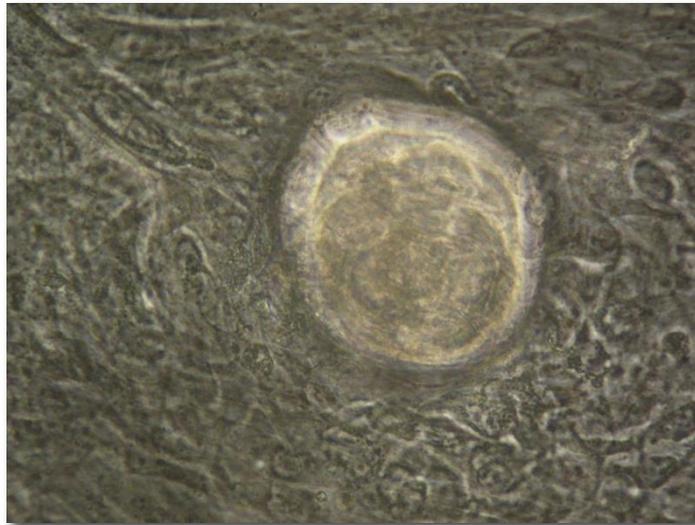


Fig. 9 Fotografia 40x di co-coltura fibroblasti-cheratinociti

2.2.2 Allestimento dei campioni sperimentali

Dopo aver ottenuto le monoculture di fibroblasti e di cheratinociti e le co-culture cheratinociti-fibroblasti, la sperimentazione è stata programmata allestendo due gruppi identici, un gruppo test e un gruppo controllo, suddividendo le colture in multi-well in plastica trasparente da 12 pozzetti di 1 cm di diametro, con coperchio (Euroclone™). La confluenza dei fibroblasti utilizzati per l'allestimento dei campioni si attestava al 90%, mentre i cheratinociti hanno raggiunto il 70% di confluenza prima di essere utilizzati per la fase sperimentale. Ogni pozzetto conteneva fibroblasti in un numero di 50000 cellule e cheratinociti in un numero di 100000 cellule, sia per quanto riguarda le monoculture sia per quanto riguarda le co-culture. Per tutti i campioni (mono- e co-culture) è stato utilizzato il terreno di crescita utilizzato per la creazione delle co-culture fibroblasti-cheratinociti.

Gruppo A (test):

- 3 pozzetti contenenti co-culture cheratinociti-fibroblasti
- 3 pozzetti contenenti colture di fibroblasti
- 3 pozzetti contenenti colture di cheratinociti

Gruppo B (controllo):

- 3 pozzetti contenuti co-culture cheratinociti-fibroblasti
- 3 pozzetti contenenti colture di fibroblasti
- 3 pozzetti contenenti colture di cheratinociti

2.2.3 Irradiazione

A 24 ore dall'allestimento dei campioni, le colture del gruppo A sono state poste in cappa sterile e stimulate mediante laser a diodi a onda continua (Wiser, Lambda™) a intervalli di 48 ore per 10 giorni. L'irradiazione è stata eseguita utilizzando un particolare manipolo (Onda Piana, Lambda™) stabilizzato perpendicolarmente al fondo del pozzetto di coltura tramite braccio meccanico, a distanza ravvicinata alla superficie del pozzetto (Fig.10,11). Questo particolare tipo di manipolo permette di mantenere inalterate le proprietà dell'energia irradiata ad una distanza variabile da 0 a 105 cm; inoltre permette un assorbimento ottimale dell'energia da parte del bersaglio irradiato con una superficie di 1 cm². Lo strumento laser è stato impostato secondo i seguenti parametri:

- Densità di energia: 50 J/cm²
- Tempo di esposizione: 50 sec
- Lunghezza d'onda: 980 nm



Fig. 10 Campioni del gruppo "Test" in fase di biostimolazione

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO



Fig. 11 Manipolo “Onda Piana” su braccio meccanico

Nessun tipo di biostimolazione viene eseguita nel gruppo B. Durante l’intera fase sperimentale i multi-well contenenti i campioni sono stati conservati in incubatrice umidificata a 37°C con 5% CO₂, tranne nei momenti di irradiazione durante i quali anche i multi-well contenenti i campioni del gruppo controllo vengono estratti dall’incubatrice e tenuti nella stessa cappa in cui viene praticata la biostimolazione sui campioni del gruppo test, al fine di mantenere le stesse condizioni per le colture di entrambi i gruppi. Nella fase di biostimolazione, i coperchi dei multi-well vengono rimossi in modo da permettere al raggio laser di raggiungere la superficie delle colture. Il terreno di crescita delle colture dei campioni è stato sostituito ogni 3 giorni.

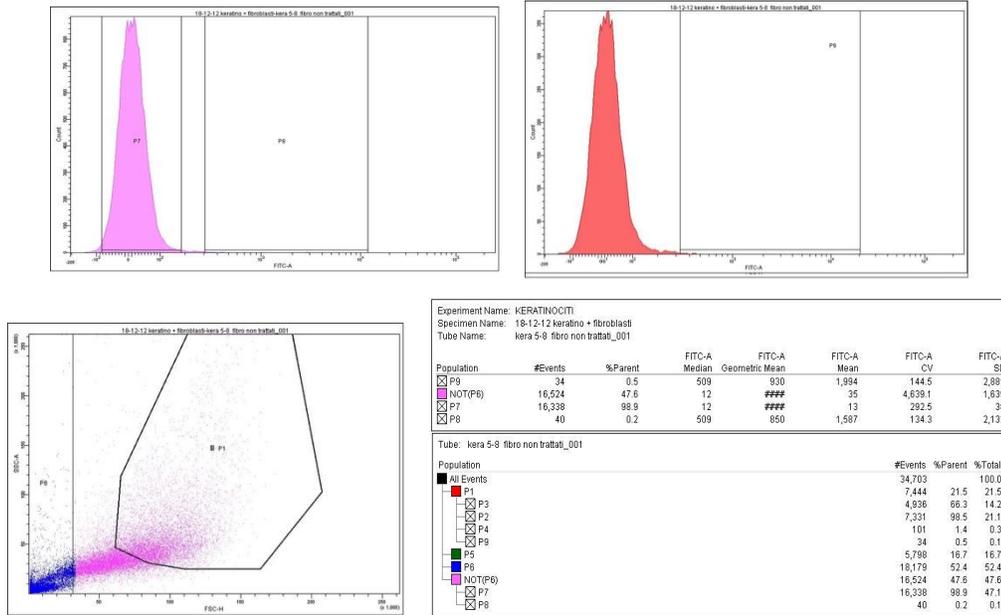
2.2.4 Raccolta dati

L'analisi dei campioni di entrambi i gruppi e la successiva raccolta dati sono cominciate 48 ore dopo il termine dell'ultima irradiazione. Le analisi si sono basate sulla ricerca e la quantificazione della cheratina tramite citofluorimetria a flusso e western blotting. Per le analisi mediante citofluorimetro (FACSCanto, BD Neurosciences™) è stato utilizzato un anticorpo monoclonale reattivo alle citocheratine 5 e 8 (KRT 5/8, Antibodies-online™), ritenuto adeguato per l'alta reattività indicata dal produttore delle linee cellulari utilizzate in questa sperimentazione verso questa famiglia di cheratine. L'elaborazione dei dati derivanti dall'analisi al citofluorimetro è stata eseguita mediante software Diva (DeNovo Software™). Anche per le analisi mediante western blotting è stato utilizzato un anticorpo reattivo alle citocheratine 5 e 8, avendo però in questo caso la possibilità di analizzare distintamente le espressioni delle due cheratine. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita secondo test T di student con un livello di confidenza del 95% ($p < 0,05$) tramite software di elaborazione dati (Prism 6, GraphPad™).

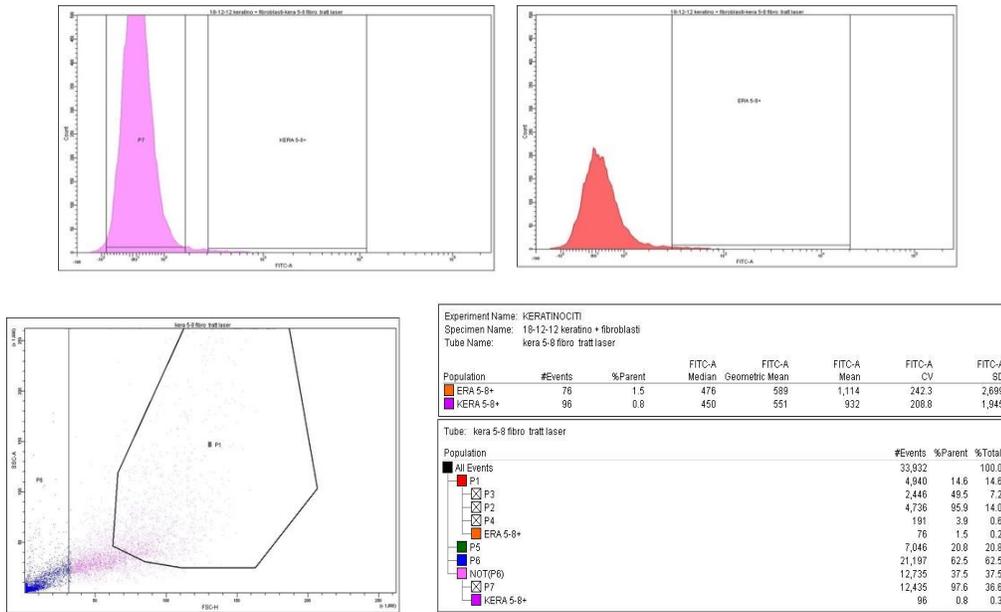
2.3 RISULTATI

I grafici e le tabelle che mostrano i dati ottenuti tramite esami al citofluorimetro a flusso, e gli ingrandimenti fotografici dei campioni a fine trattamento sono riportati di seguito. I grafici dei risultati al FACS si riferiscono all'espressione di cheratina 5/8 totale e all'espressione specifica della proteina (P9 o ERA 5-8+) ottenuta escludendo la porzione positiva aspecifica (P7), il cosiddetto “rumore di fondo”, dalla popolazione presa in esame (P1).

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

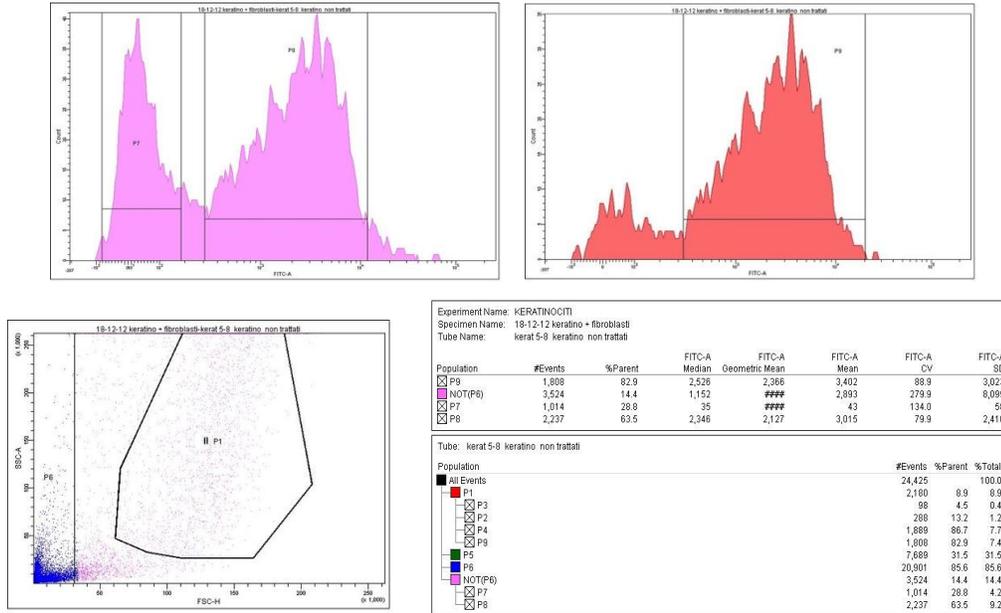


Espressione KRT 5-8 al FACS delle colture fibroblasti gruppo controllo

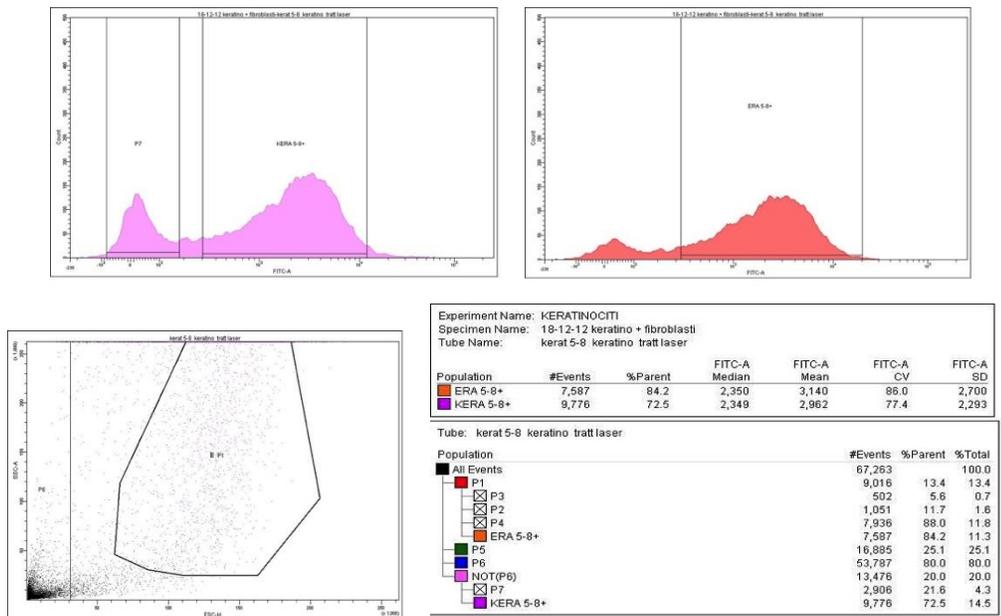


Espressione KRT 5-8 al FACS delle colture fibroblasti gruppo test

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

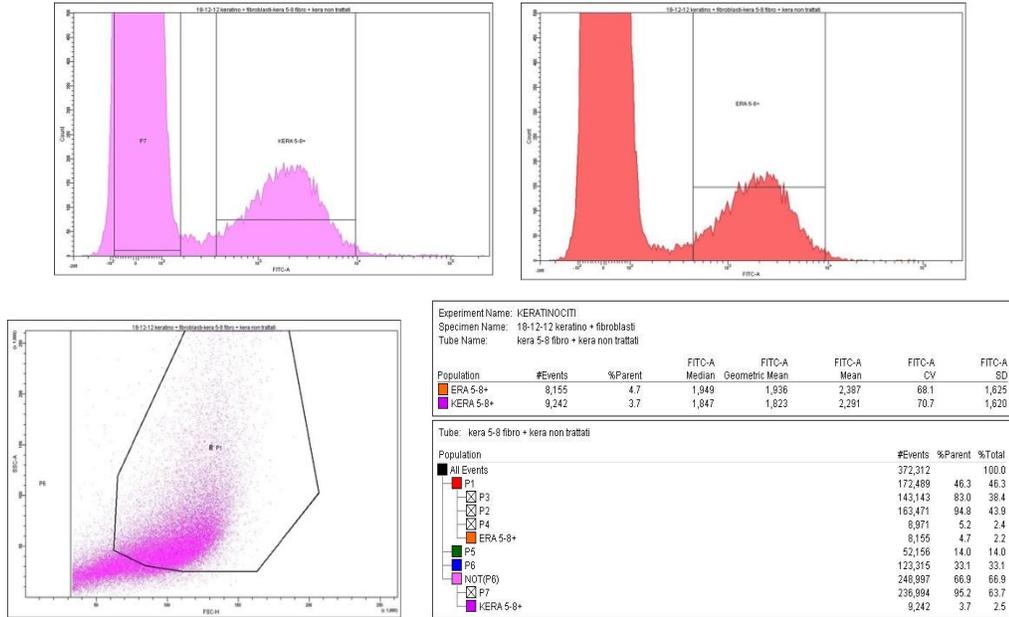


Espressione KRT 5-8 al FACS delle colture cheratinociti gruppo controllo

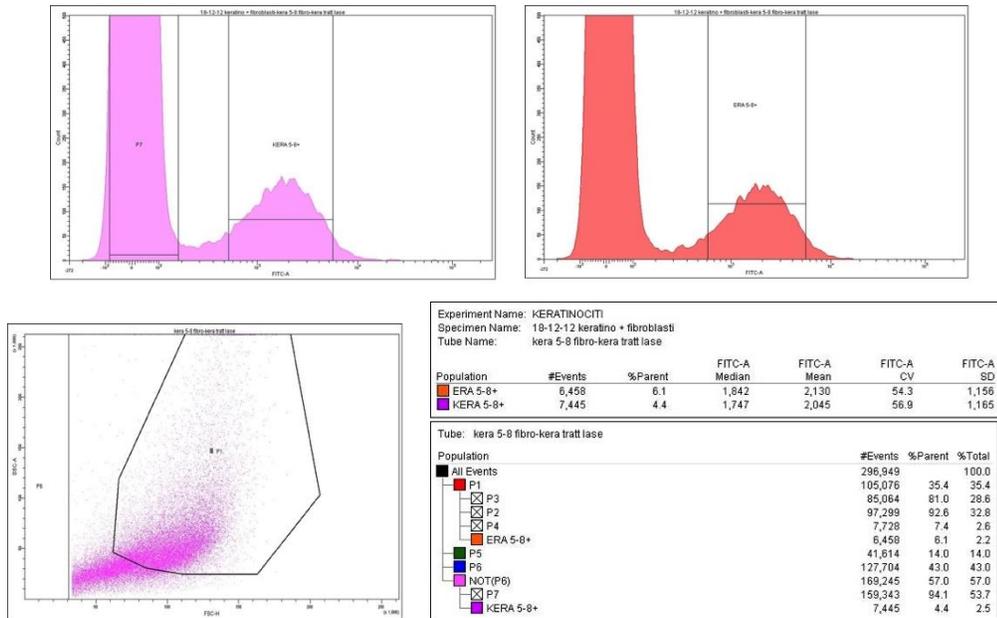


Espressione KRT 5-8 al FACS delle colture cheratinociti gruppo test

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO



Espressione KRT 5-8 al FACS delle co-culture gruppo controllo



Espressione KRT 5-8 al FACS delle co-culture gruppo test

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL
DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

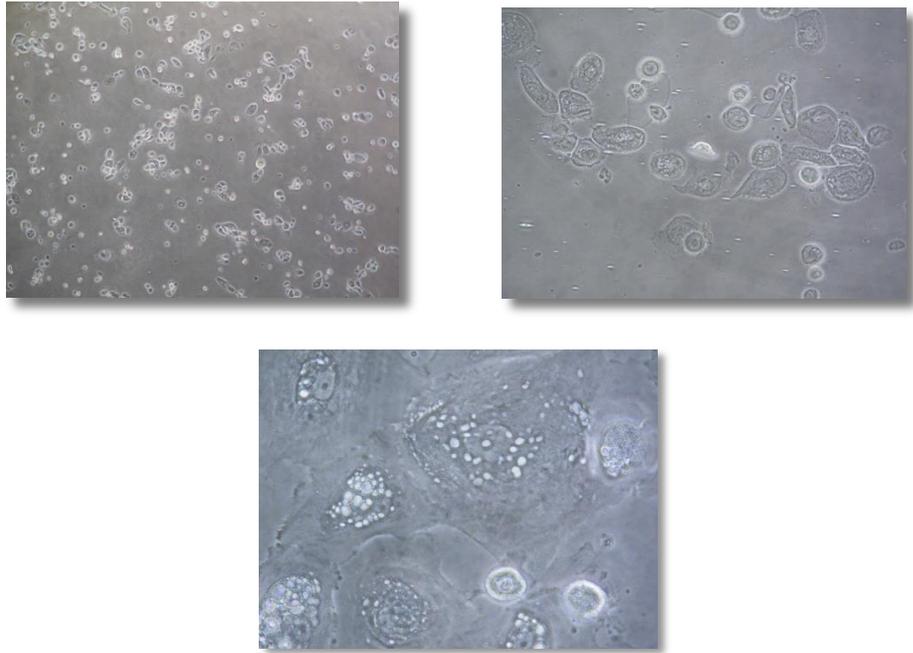


Fig.12,13,14 Fotografie 10-20-40x dei campioni cheratinociti controllo



Fig.15,16,17 Fotografie 10-20-40x dei campioni cheratinociti test

**EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL
DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO**

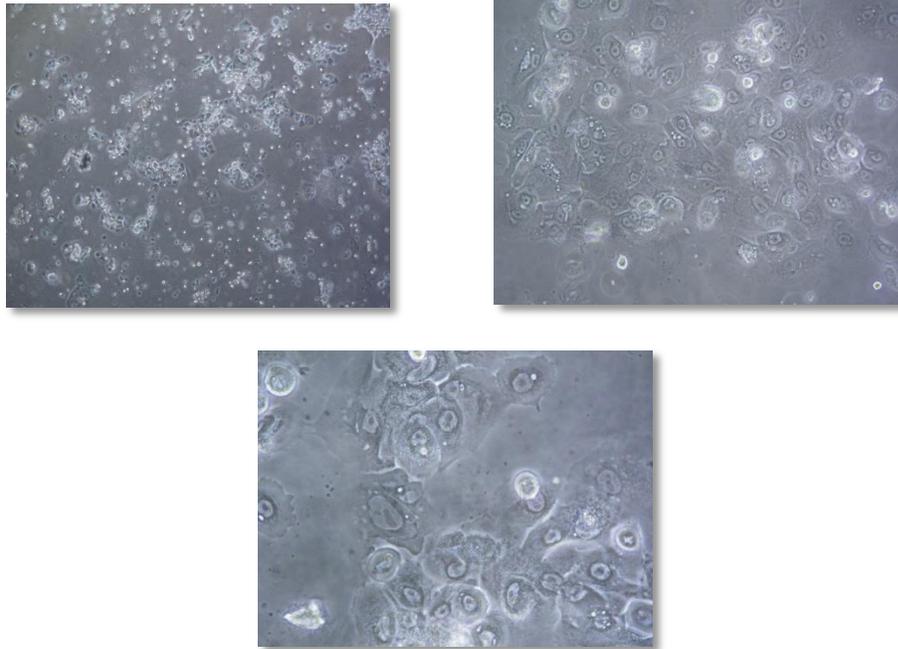


Fig.18,19,20 Fotografie 10-20-40x dei campioni co-culture controllo

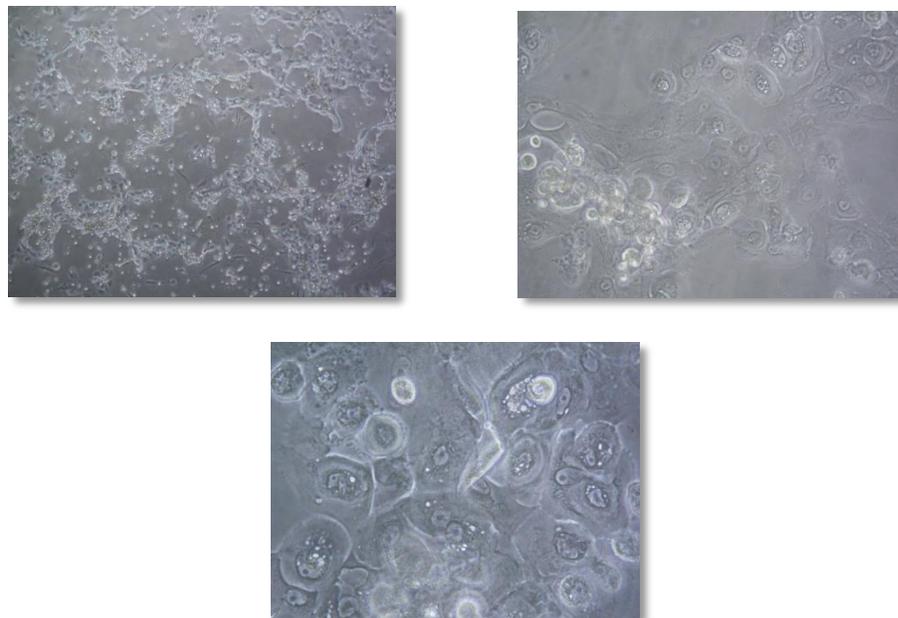


Fig.21,22,23 Fotografie 10-20-40x dei campioni co-culture test

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

L'analisi Western Blotting è stata impostata analizzando separatamente l'espressione della cheratina 5 e della cheratina 8 dei campioni dei due gruppi. Per normalizzare i dati prodotti è stata eseguito un controllo di caricamento per avere la certezza di aver caricato la stessa quantità di estratto proteico in tutte le lane di analisi. Ciò è stato ottenuto eseguendo prima un'analisi di espressione della actina e successivamente normalizzando i dati ottenuti dall'analisi di espressione della cheratina con quelli di espressione della actina. Le immagini e la tabella contenente i risultati dell'analisi al densitometro sono riportate di seguito.



Fig. 24 Western blotting dei campioni. Superiormente l'espressione a KRT 5, inferiormente a KRT 8. Da sinistra a destra l'espressione di fibroblasti, cheratinociti e co-culture

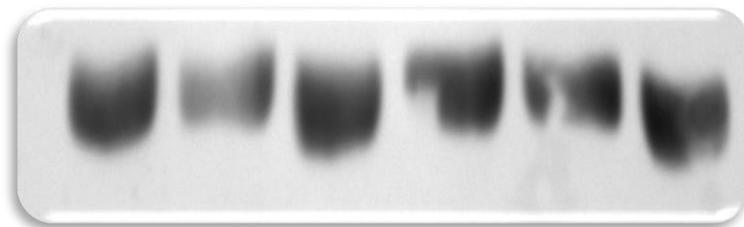


Fig. 25 Controllo di caricamento mediante test di actina

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

CONTROLLO						
	FIBRO		CHERA		FBR+KRT	
	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean
ACTINA	2.006.000,00	1.872,57	944.592,12	1.423,27	2.328.000,00	1.927,77
KRT 5			57.869,93	650,39	2.601.000,00	1.381,04
KRT 8			527.178,34	841,89	5.253.000,00	1.594,59

VALORI NORMALIZZATI RISPETTO ALL'ACTINA

	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean
KRT 5			0,06	0,46	1,12	0,72
KRT 8			0,56	0,59	2,26	0,83

LASER						
	FIBRO		CHERA		FBR+KRT	
	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean
ACTINA	2.263.000,00	1.927,48	1.524.000,00	1.712,62	2.211.000,00	1.900,59
KRT 5			50.231,63	696,70	1.999.000,00	1.403,40
KRT 8			1.604.000,00	1.233,59	6.093.000,00	2.132,20

VALORI NORMALIZZATI RISPETTO ALL'ACTINA

	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean	Net intensity	Mean
KRT 5			0,03	0,41	0,90	0,74
KRT 8			1,05	0,72	2,76	1,12

Tab. 2 Valori densitometrici calcolati sulle analisi Western Blotting dei campioni

2.4 DISCUSSIONE

Studi sulla laser terapia a basso livello applicata a popolazioni cellulari sono presenti in grande quantità nella letteratura internazionale (Tab. 1). La dose di irradiazione laser utilizzata in questi studi risulta in media di 5 J/cm^2 ; è stato osservato come l'applicazione di una fluenza troppo superiore a questo valore possa portare a una inibizione degli indici di proliferazione e vitalità cellulare fino ad una apoptosi cellulare. Tuttavia in questo studio si è deciso di utilizzare una fluenza relativamente alta (50 J/cm^2) con applicazioni ripetute nel tempo (ogni 48 ore per 10 giorni). L'ipotesi di base consiste nel fornire alle cellule uno stimolo sufficientemente intenso da poter stimolare un aumento della produzione di cheratine, analogamente a quello che succede nello sviluppo della ipercheratosi epidermica in seguito a traumi o stress ripetuti e costanti nel tempo, portando alla formazione di calli plantari o palmari. L'eventuale applicazione clinica in ambito parodontale è rappresentata dalla possibilità di aumentare il volume dello strato cheratinizzato del tessuto gengivale attorno a elementi dentari e/o impianti.

I dati ottenuti tramite analisi al citofluorimetro a flusso mostra situazioni diverse a seconda dei campioni analizzati. Come previsto, i fibroblasti di entrambi i gruppi (test e controllo) hanno mostrato una positività alla cheratina 5/8 molto bassa (rispettivamente 1,5% e 0,5%) con una differenza statisticamente non significativa fra le espressioni di cheratina 5-8 dei due gruppi ($p=0,1365$). In seguito al trattamento con il laser si ha avuto un incremento nel numero di fibroblasti positivi, ma su una percentuale molto bassa. L'analisi dei campioni di cheratinociti in monocultura ha mostrato invece una differenza statisticamente significativa ($p=0,0007$) fra l'espressione di cheratina 5/8 del gruppo controllo e del gruppo test. Analogamente, l'analisi dei campioni di co-culture dei due gruppi ha mostrato una differenza statisticamente significativa ($p<0,0001$) fra campioni trattati e non

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

trattati con la biostimolazione laser. Nonostante le analisi statistiche dei dati ottenuti dai campioni test sia delle mono-culture di cheratinociti sia delle co-culture mostrino una minor espressione di cheratina 5/8 nei campioni trattati rispetto ai campioni controllo, è interessante notare come nei campioni biostimolati si ha un aumento nella percentuale di cellule positive alla cheratina sia nelle colture di cheratinociti (82,9% nel gruppo controllo e 84,2% nel gruppo test) sia nelle co-culture di fibroblasti e cheratinociti (4,7% nel gruppo controllo e 6,1% nel gruppo test), come mostrato nei grafici 1 e 2.

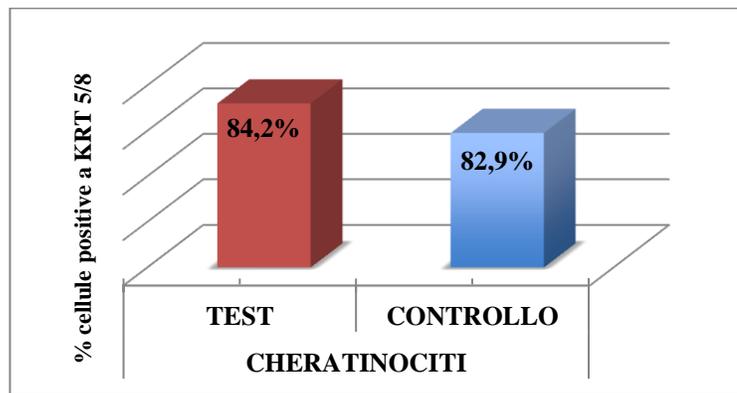


Grafico 1. Cellule positive alla cheratina 5/8 nelle mono-culture di cheratinociti

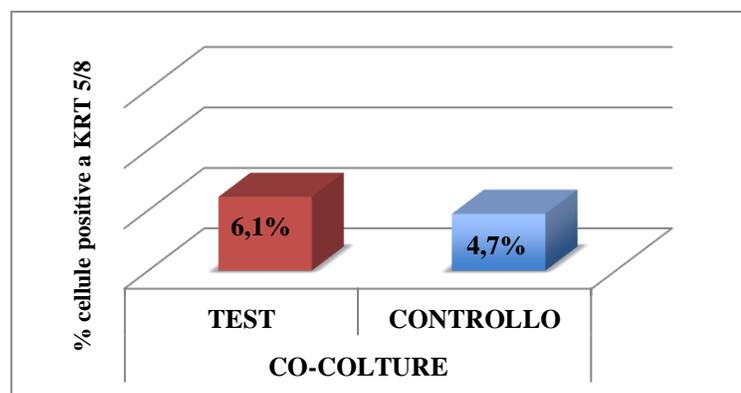


Grafico 2. Cellule positive alla cheratina 5/8 nelle co-culture

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

Le percentuali sensibilmente più basse di cellule positive alla cheratina nelle co-culture rispetto alle colture di cheratinociti possono essere giustificate dalla presenza nelle co-culture della popolazione dei fibroblasti che, come dimostrato dalle analisi delle mono-culture dei fibroblasti, hanno una positività quasi nulla alla cheratina (Grafico 3).

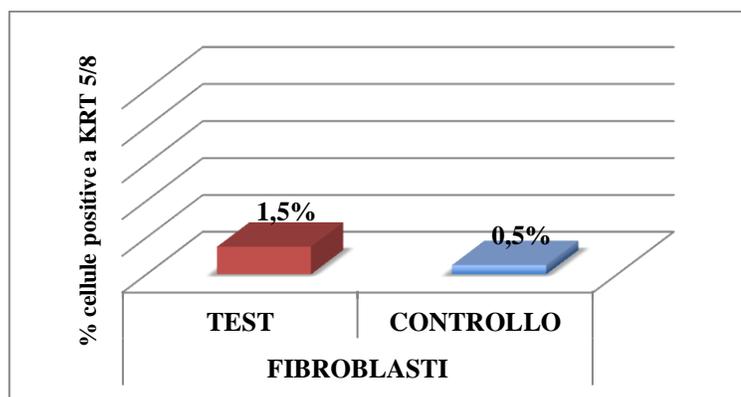


Grafico 3. Cellule positive alla cheratina 5/8 nelle mono-culture di fibroblasti

I dati derivanti dalle analisi tramite western blotting suggeriscono diverse considerazioni: innanzitutto, come già evidenziato dalle analisi al citofluorimetro, nei campioni delle colture di fibroblasti non è stata rilevata espressione della cheratina 5 né della cheratina 8. Nelle mono-culture di cheratinociti è stata osservata una diminuzione della espressione della cheratina 5 nei campioni del gruppo irradiato, e un modesto incremento di espressione della cheratina 8 sempre nei campioni del gruppo test. Il dato più interessante senza dubbio le analisi di espressione dei campioni di co-culture: è stato osservato infatti un modesto incremento dell'espressione della cheratina 5 nei campioni del gruppo test, ma in particolare un notevole incremento dell'espressione della cheratina 8 sempre nei campioni del gruppo test.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

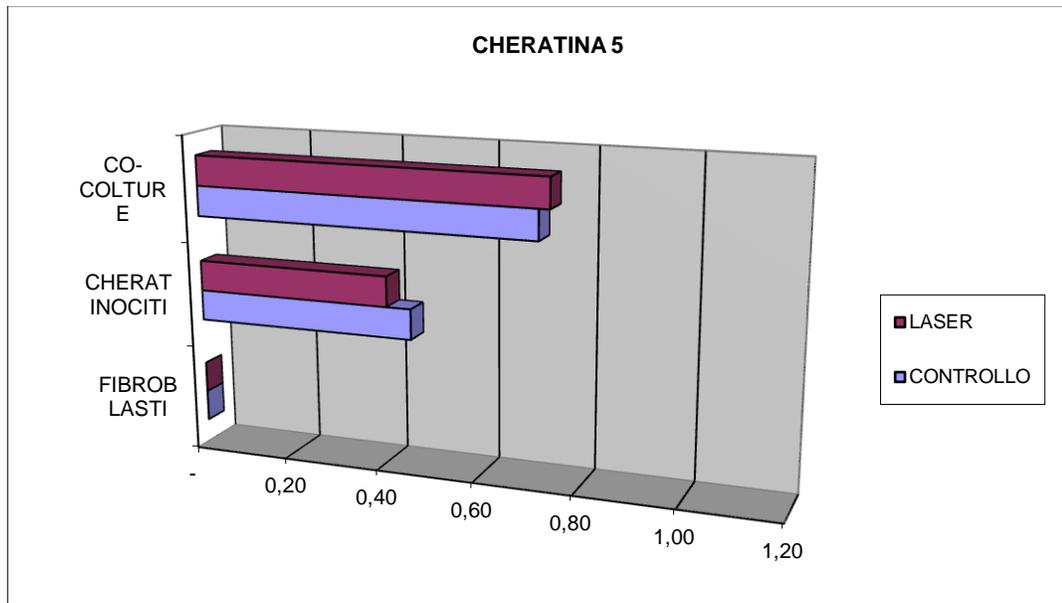


Grafico 4. Espressione della cheratina 5 tramite Western Blotting

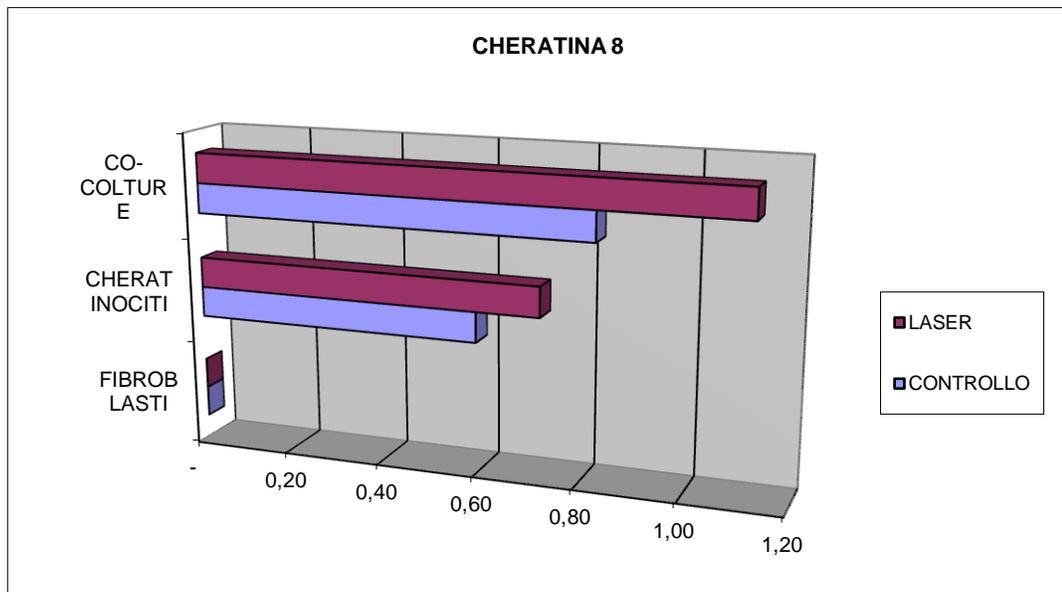


Grafico 5. Espressione della cheratina 8 tramite Western Blotting

2.5 CONCLUSIONI

Studi sulla laser terapia a basso livello, in particolare se applicata a colture cellulari, sono presenti in grandi quantità in letteratura internazionale. Questi studi valutano l'effetto della biostimolazione laser in termini di vitalità, proliferazione, adesione, migrazione, sintesi proteica e di fattori di crescita, con un range di applicazione della laser terapia da 0,12 a 20 J/cm² di fluensa. La revisione della letteratura non ha però messo in luce uno studio riguardo agli effetti della laser terapia a basso livello sulla produzione di cheratine da parte di fibroblasti e/o cheratinociti. L'ipotesi di base di questo studio presupponeva l'applicazione di una dose di raggi laser sufficientemente intensa da portare ad un aumento nella produzione di cheratina da parte delle cellule irradiate come avviene a livello del tessuto epiteliale in seguito a trami meccanici ripetuti nel tempo. Nonostante siano stati utilizzati dei parametri di fluensa dello strumento laser significativamente superiori a quelli indicati dalla letteratura internazionale, è stato possibile mantenere la sopravvivenza delle colture irradiate come dimostrato dagli ingrandimenti fotografici dei campioni dei gruppi test e controllo. Infatti l'utilizzo di un innovativo manipolo collegato allo strumento laser a diodi ha permesso un assorbimento ottimale dell'energia laser da parte delle colture evitando effetti inibitori della vitalità o peggio apoptotici che vengono descritti in letteratura quando viene utilizzata una fluensa superiore ai 20 J/cm² nella applicazione della laser terapia a basso livello.

I risultati derivanti dall'analisi al citofluorimetro a flusso portano a fare alcune considerazioni: dato che hanno mostrato un aumento della percentuale di cellule positive alla cheratina 5-8 nei campioni del gruppo biostimolato (test) rispetto ai campioni del gruppo non trattato (controllo), sia per quanto riguarda le colture di cheratinociti sia per le co-colture, ma una diminuzione della positività totale alla

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

cheratina dei campioni test rispetto al controllo, si potrebbe concludere che confrontando i risultati dei due gruppi, la biostimolazione laser dei campioni del gruppo test ha causato una diminuzione, al termine della sperimentazione, del numero di cellule che già esprimevano cheratina, portando quindi ad una minor espressione totale della cheratina rilevata dal citofluorimetro, ma un aumento delle cellule positive alla cheratina in rapporto alla popolazione totale dei campioni del gruppo test. Quindi, se da un lato la biostimolazione laser, impostata coi parametri utilizzati in questo studio, non è stata in grado di ottenere un aumento della quota totale di cheratina nei campioni analizzati, sembra essere stata in grado di stimolare un maggior numero di cellule alla sintesi di cheratina, rispetto ai campioni analizzati del gruppo non trattato.

I risultati derivanti dalle analisi Western Blotting portano principalmente a due conclusioni: è stata osservata una diminuzione di espressione della cheratina 5 nei cheratinociti del gruppo test, un modesto aumento dell'espressione di cheratina 8 nei cheratinociti del gruppo test e di cheratina 5 nelle co-culture sempre del gruppo test, e un notevole aumento di espressione di cheratina 8 nelle co-culture del gruppo test. Da questi dati si può concludere quindi che la differenza di espressione fra i campioni dei due gruppi (cioè una diminuzione dell'espressione totale nel gruppo irradiato) mostrata dalle analisi al citofluorimetro possono essere spiegate dal fatto che i cheratinociti utilizzati in questo studio producano molta meno cheratina 5 rispetto alla cheratina, che risulta invece aumentata in seguito a biostimolazione laser come dimostrato dal western blotting. Infine, l'aumento di espressione di cheratina 5 e di cheratina 8 nelle co-culture irradiate indica come nella sperimentazione sia stata determinante la sinergia fra biostimolazione laser e presenza del comparto mesenchimale rappresentato dai fibroblasti per stimolare una maggior sintesi di cheratina nelle co-culture del gruppo test.

2.6 PROSPETTIVE FUTURE

Poiché non è stato possibile riscontrare in letteratura internazionale altri studi che condividessero la medesima ipotesi di base, questo studio pilota è stato progettato ed impostato compatibilmente coi dati che la letteratura offre in termini di laser terapia a basso livello e di coltura cellulare, con la strumentazione innovativa utilizzata, con i parametri che l'ipotesi sperimentale indicava come idonei, e all'esperienza in questi settori dei singoli operatori che hanno preso parte alle sperimentazioni. I buoni risultati ottenuti possono indicare la possibilità di intraprendere studi futuri ancora più approfonditi, modificando in particolare alcuni fattori:

- Numerosità: estendere il numero dei campioni esaminati.
- Tipo di popolazione cellulare: utilizzare, al posto di linee cellulari disponibili commercialmente, fibroblasti e cheratinociti ottenuti da prelievi bioptici provenienti da tessuti orali (mucosa alveolare, gengiva aderente, ecc..).
- Morfologia delle co-culture: perfezionare l'allestimento delle colture organotipiche per ottenere una condizione in vitro che possa mimare in modo ancora più approfondito le condizioni dei tessuti in vivo; ad esempio utilizzando una matrice tridimensionale di collagene e fibroblasti per lo strato dermico delle co-culture, prima di inseminare le cellule di cheratinociti. Ciò non è stato operato in questo studio a causa del forte rischio di bias nella raccolta dati, in quanto il collagene avrebbe interferito con falsi positivi durante la fase di identificazione della cheratina.
- Parametri laser: variare la dose di irradiazione dei campioni in termini di potenza e tempo di erogazione dello strumento laser, per poter stabilire se esistano parametri diversi che diano risultati ancora migliori per soddisfare l'ipotesi di base.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

- Intervalli di trattamento: variare non solo la tempistica totale della fase di biostimolazione delle colture, ma inoltre il numero di irradiazioni e gli intervalli di tempo fra le singole irradiazioni, per poter creare un algoritmo che consenta la massima biostimolazione col minor danno cellulare utilizzando manipoli di nuova concezione.
- Raccolta dati: utilizzare tecniche di indagine che consentano di identificare la posizione delle cellule che hanno sintetizzato cheratina in seguito a biostimolazione delle co-colture, per capire se queste effettivamente vanno a posizionarsi sullo strato terminale mimando una ipercheratosi. Questo può essere ottenuto mediante immunohistochimica o immunofluorescenza.

3. BIBLIOGRAFIA

1. Carranza Jr FA, Carraro J. "Mucogingival techniques in periodontal surgery." J Periodontol 1970; 41:294-9.
2. Lang NP, Löe H. "The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health." J Periodontol 1972; 43:623-7.
3. Corn H. "Periosteal separation: its clinical significance." J Periodontol 1962; 33:140-53.
4. Wennström J, Lindhe J. "Plaque-induced gingival inflammation in the absence of attached gingiva in dogs." J Clin Periodontol 1983; 10:266-76.
5. Wennström J, Lindhe J. "Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs." J Clin Periodontol 1983; 10:206-21.
6. Wennström J, Lindhe J, Nyman S. "Role of keratinized gingiva for gingival health. Clinical and histologic study of normal and regenerated gingival tissue in dogs." J Clin Periodontol 1981; 8:311-28.
7. Ericsson I, Lindhe J. "Recession in sites with inadequate width of the keratinized gingiva. An experimental study in the dog." J Clin Periodontol 1984; 11:95-103.
8. Wennström JL, Lindhe J, Sinclair F, Thilander B."Some periodontal tissue reactions to orthodontic tooth movement in monkeys. J Clin Periodontol 1987; 14:121-9.
9. Krygier G, Glick PL, Versman KJ, Dahlin CJ, Cochran DL. "To minimize complications, is it essential that implant abutments be surrounded by keratinized tissue?" Int J Oral Maxillofac Implants 1997; 12:127.
10. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI, Lindhe J, Eriksson B, et al. "Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

- longitudinal prospective study.” *Int J Oral Maxillofac Implants* 1986; 15:39-52.
11. Albrektsson T, Zarb G, Worthington P, Eriksson AR. “The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success.” *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986;1:11-25.
 12. Warrer K, Buser D, Lang NP, Karring T. “Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys.” *Clin Oral Implants Res* 1995; 6:131-8.
 13. Cairo F, Pagliaro U, Nieri M. “Soft tissue management at implant sites.” *J Clin Periodontol* 2008; 35:163-7.
 14. Esposito M, Grusovin MG, Maghaireh H, Coulthard P, Worthington HV. “Interventions for replacing missing teeth: management of soft tissues for dental implants.” *Cochrane Database Sys Rev* 2007; 18:CD006697.
 15. Maynard Jr JG, Ochsenein C. “Mucogingival problems, prevalence and therapy in children.” *J Periodontol* 1975; 46:543-52.
 16. Pearson LE. “Gingival height of lower central incisors, orthodontically treated and untreated.” *Angle Orthodont* 1968; 38:337-9.
 17. Bimstein E, Machtei E, Becker A. “The attached gingiva in children: diagnostic, developmental and orthodontic considerations for its treatment.” *American Society of Dentistry for children* 1988; 55:351-6.
 18. Yared KF, Zenobio EG, Pacheco W. “Periodontal status of mandibular central incisors after orthodontic proclination in adults.” *Am J Orthod Dentofac Orthop* 2006; 130:e1-8.
 19. Levin L, Samorodnitzky-Naveh GR, Machtei EE. “The association of orthodontic treatment and fixed retainers with gingival health. *J Periodontol* 2009; 79:2087-9.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

20. Bollen AM. "Effects of malocclusions and orthodontics on periodontal health: evidence from a systematic review." *J Dent Educ* 2008;72:912-8.
21. Claffey N, Shanley D. "Relationship of gingival thickness and bleeding to loss of probing attachment in shallow sites following nonsurgical periodontal therapy." *J Clin Periodontol* 1986; 13:654-7.
22. Hwang D, Wang HL. "Flap thickness as a predictor of root coverage: a systematic review." *J Clin Periodontol* 2006;77:1625-34.
23. Cortellini P, Tonetti M. "Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration." *Periodontol* 2000 1999; 22:104-32.
24. Mehta P, Lim LP. "The width of the attached gingiva – Much ado about nothing?" *J Dent* 2010 38(7):517-25.
25. Billingham RE, Silver WK. "Studies on the conservation of epidermal specificities of skin and certain mucosae in adult mammals." *J Exp Med* 1966; 125:429.
26. Doran TI, Vidrich AL, Sun TT. "Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells." *Cell* 1980; 22:17.
27. Mackenzie IC, Hill MW. "Connective tissue influences on patterns of epithelial architecture and keratinization in skin and oral mucosa of the adult mouse." *Cell Tissue Res* 1984; 235:551.
28. Konstantinova NV, Lemak NA, Duong DMT, Chuang AZ, Urso R, Duvic M. "Artificial skin equivalent differentiation depends on fibroblast donor site: use of eyelid fibroblasts." *Plast Reconstr Surg* 1998; 101:385.
29. Yanguchi Y, Itami S, Tarutani M, Hosokawa K, Miura H, Yoshikawa K. "Regulation of keratin 9 in non-palmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblast through epithelial-mesenchymal interaction." *J Invest Dermatol* 1999; 112:483.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

30. Boukamp P, Breitkreutz D, Stark HJ, Fusenig NE. "Mesenchyme-mediated and endogenous regulation of growth and differentiation of human skin keratinocytes derived from different body sites." *Differentiation* 1990; 44:150.
31. Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE. "Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal interaction." *J Cell Biol* 1993; 122:417.
32. Okazaki M, Yoshimura K, Fujiwara H, Suzuki Y, Harii K. "Induction of hard keratin expression in non-nail-matrix keratinocytes by nail-matrix fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions." *Plast Reconstr Surg* 2003; 111:286.
33. Ueda M, Hata K, Horie K, Torii S. "The potential of oral mucosal cells for cultured epithelium: a preliminary report." *Ann Plast Surg* 1995; 35:498.
34. Hata K, Kagami H, Ueda M, Torii S, Matsuyama M. "The characteristics of cultured mucosal cell sheet as a material for grafting: comparison with cultured epidermal cell sheet." *Ann Plast Surg* 1995; 34:530.
35. Carls FR, Jackson IT, Behl AK, Lebeda R, Webster H. "Prefabrication of mucosa-lined flap: a preliminary study in the pig model." *Plast Reconstr Surg* 1998; 101:1022.
36. Rath T, Tairysh GV, Frey M, Lang S, Millesi W, Glaser C. "Neuromucosal prelaminated flaps for reconstruction of intraoral lining defects after radical tumor resection." *Plast Reconstr Surg* 1999; 103:821.
37. Schlenz I, Korak KJ, Kunstfeld R, Vinzenz K, Plenck HJ, Holle J. "The dermis-prelaminated flaps scapula flap for reconstructions of the hard palate and the alveolar ridge: a clinical and Histologic evaluation." *Plast Reconstr Surg* 2001; 108: 1519.
38. Lauer G, Schimming R, Gellrich NC, Schmellzeisen R. "Prelaminating the fascial radial forearm flap by using tissue-engineered mucosa: improvement of donor and recipient site." *Plast Reconstr Surg* 2001; 108:1564.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

39. Kunstfeld R, Petzelbauer P, Wickenhauser G et al. "The prefabricated scapula flap consists of syngeneic bone, connective tissue, and a self-assembled epithelial coating." *Plast Reconstr Surg* 2001; 108:1908.
40. Okazaki M, Yoshimura K, Suzuki Y, Harii K. "Effects of subepithelial fibroblasts on epithelial differentiation in human skin and oral mucosa: heterotypically recombined organotypic culture model." *Plast Reconstr Surg* 2003; 112(3):784-92.
41. Tsunenaga M, Kohno Y, Horii I, et al. "Growth and differentiation properties of normal and transformed human keratinocytes in organotypic culture." *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:238.
42. Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP. "Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation." *Am J Pathol* 1997; 151:317-22.
43. Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. "Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth." *Science* 1989; 245:752-5.
44. Dabelsteen S, Wandall HH, Gron B, Dabelsteen E. "Keratinocyte growth factor mRNA expression in periodontal ligament fibroblasts." *Eur J Oral Sci* 1997; 105:593-8.
45. Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. "The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds." *Science* 1994; 266:819-22.
46. Grøn B, Stoltze K, Andersson A, Dabelsteen E. "Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes". *APMIS* 2002; 110(12):892-8.
47. Cobb CM. "Lasers in periodontics: a review of the literature." *J Periodontol* 2006; 77(4):454-64.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

48. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zangaro RA, Guidugli-Neto J, Jeager MM. "Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence." *Lasers Surg Med* 2001; 29:179-84.
49. Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. "Effect of Low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts." *Lasers Surg Med* 2002; 31:263-67.
50. Kreisler M, Daublander M, Willershausen-Zonnchen B, d'Hoedt B. "Effect of diode laser irradiation on the survival rate of gingival fibroblast cell cultures." *Laser Surg Med* 2001;28:445-50.
51. Chen YJ, Jeng JH, Lee BS, Chang HF, Chen KC, Lan WH. "Effects of Nd:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts." *Laser Surg Med* 2000; 27:471-78.
52. Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Ishikawa I. "Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts." *J Periodontol* 2005; 76(2):187-93.
53. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. "780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocytes cultures: involvement of reactive oxygen species." *Lasers Surg Med* 1998; 22:212-18.
54. Pogrel MA, Chen JW, Zhang K. "Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes" *Lasers Surg Med* 1997; 20:426-32.
55. Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudas J. "Differential responses of fibroblasts, non-neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy." *Support Care Cancer* 2012; 20:523-9.
56. 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

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

- a biostimulative effect on different cells of the oral microenvironment: an in vitro study". *Lasers Surg Med* 2010; 42(6):527-39.
57. Skinner SM, Gage JP, Wilce PA, Shaw RM. "A preliminary study of the effects of laser radiation on collagen metabolism in cell culture." *Aust Dent J*. 1996; 41(3):188-92.
 58. Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R. "780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species." *Lasers Surg Med* 1998; 22:212-218.
 59. Haas AF, Wong JW, Iwahashi CK, Halliwell B, Cross CE, Davis PA. "Redox regulation of wound healing? NF-KB Activation in cultured human keratinocytes upon wounding and the effect of low energy HeNe Irradiation." *Free Radic Biol Med* 1998; 25(9):998-1015.
 60. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS. "Low-Energy Helium-Neon laser irradiation stimulates interleukin-1 α and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes." *J Invest Dermatol* 1996; 107:593-96.
 61. Chiu LL, Sun CH, Yeh AT, Torkian B, Karamzadeh A, Tromberg B, Wong B. "Photodynamic therapy on keloid fibroblasts in tissue-engineered keratinocyte-fibroblast co-culture." *Lasers Surg Med* 2005; 37:231-44.
 62. Azevedo LH, Eduardo FdP, Moreira MS, Eduardo CdP, Marques MM. "Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth." *Lasers Med Sci* 2006; 21:86-89.
 63. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. "Low-level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts." *Lasers Surg Med* 2002; 30:365-69.
 64. Marques MM, Pereira AN, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. "Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts". *Lasers Surg Med* 2004; 34:260-65.

EFFETTI DELLA BIOSTIMOLAZIONE LASER SUL TESSUTO EPITELIALE PER IL DIFFERENZIAMENTO DELLO STRATO CHERATINIZZATO: STUDIO IN VITRO

65. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declerq HA, Cambier DC. "Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation." *Lasers Sci Med* 2003; 18:95-99.
66. Stark HJ, Baur M, Breitzkreutz D, Mirancea N, Fusenig NE. "Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation." *J Invest Dermatol* 1999; 112:681-91.
67. Taichman L, Sciubba J, Cho MI. "Maturation of human gingival keratinocytes cultured with fibroblasts from keratinizing and non-keratinizing epithelia." *Archs Oral Biol.* 1982; 27:355-59.
68. Roesch-Ely M, Steinberg T, Bosch FX, Mussig E, Whitaker N, Wiest T, Kohl A, Komposch G, Tomakidi P. "Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a gingival epithelial phenotype in vitro". *Differentiation* 2006; 74:622-37.
69. Chu PG, Weiss LM. "Keratin expression in human tissues and neoplasms." *Histopatology* 2002; 40:403-39.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Baldoni, che ha deciso di scommettere su di me e darmi l'incredibile opportunità di poter svolgere in questi tre anni attività cliniche e di ricerca che hanno contribuito in modo determinante alla mia formazione professionale, e che mai avrei potuto ottenere in nessun altro posto. Spero di aver ripagato anche solo in parte l'enorme fiducia che ha riposto nei miei confronti.

Ringrazio il Dott. Leonida e il Dott. Caccianiga, che con la loro esperienza hanno saputo guidarmi sapientemente durante tutto il mio percorso. Le loro indicazioni e i loro consigli sono stati fonte inesauribile di motivazione e perseveranza.

Un ringraziamento a tutto lo staff di laboratorio del Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie biomediche dell'Università Milano-Bicocca diretto dal Prof. Tredici, in particolare alla Dott.ssa Donzelli, alla Dott.ssa Caldara, alla Dott.ssa Monfrini e alla Dott.ssa Foudah. Senza la loro disponibilità e la loro professionalità nulla di tutto questo sarebbe stato possibile.

Grazie a tutti i colleghi e compagni di dottorato che mi hanno accompagnato e mi hanno sopportato durante questo viaggio di tre anni. Il loro appoggio è stato indispensabile per superare i momenti difficili e la loro partecipazione in quelli di maggior soddisfazione mi ha dato un motivo in più per sorridere.

Un doveroso ringraziamento va anche a tutti i colleghi e amici che con me hanno condiviso l'esperienza presso la Clinica di Verano Brianza, in particolare Il Dott. Monguzzi, il Dott. Pozzi, il Dott. Franceschini, la Dott.ssa Gerardi e il Dott. Ferrari. Se oggi posso considerarmi un professionista, è anche grazie a loro.

Grazie al calore ed al sostegno di tutta la mia famiglia, senza i quali non sarei mai stato in grado di arrivare fino a qui. Grazie a mia mamma per il modo in cui sopporta il mio carattere difficile e grazie a mio papà per il modo in cui, al lavoro e non, mi ha permesso di spianare le difficoltà che ho incontrato per strada. Grazie per essere quello che siete. Grazie anche a mio nonno, i cui consigli sono la perenne prova che il tempo non ha armi intaccarlo.

Un ultimo ma non meno importante ringraziamento ai miei amici, tutti, che non mi hanno mai rifiutato l'affetto e l'appoggio quando ne ho avuto bisogno.