



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE
Indirizzo Oncologia Sperimentale e Clinica

CICLO XXVII°

COORDINATORE Prof. PERSIO DELLO SBARBA

**APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NELLA
GESTIONE DELLE PATOLOGIE SECONDARIE AI
TRATTAMENTI ONCOLOGICI:
SICUREZZA ED EFFICACIA**

Settore Scientifico Disciplinare MED/04

Dottorando

Dott.ssa Cialdai Francesca

Tutore

Prof. Capaccioli Sergio

Coordinatore

Prof. Dello Sbarba Persio

Anni 2012/2014

INDICE

Introduzione

| | |
|--|----|
| 1. Patologie secondarie ai trattamenti oncologici..... | 5 |
| 1.1. Linfedema post-mastectomia..... | 6 |
| 1.2. Mucositi orali..... | 10 |
| 2. La laserterapia..... | 15 |
| 2.1. Cenni storici e principi fisici del laser..... | 15 |
| 2.2. L'interazione laser-tessuto..... | 18 |
| 2.2.1. L'interazione fotochimica..... | 19 |
| 2.2.2. L'interazione fototermica..... | 21 |
| 2.2.3. L'interazione fotomeccanica..... | 22 |
| 2.3. Effetti della laser terapia a livello sistemico: effetto antiedemigeno, antinfiammatorio, analgesico..... | 25 |
| 3. Applicazione della laserterapia nelle patologie secondarie ai trattamenti oncologici..... | 29 |
| 3.1.1. Linfedema post-mastectomia..... | 29 |
| 3.1.2. Mucositi orali..... | 30 |
| 4. Descrizione e scopo del progetto di ricerca..... | 32 |

Materiali e Metodi

| | |
|---|----|
| 1. MATERIALI E METODI RELATIVI ALLO STUDIO SULL'APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL LINFEDEMA POST-MASTECTOMIA..... | 38 |
| 1.1. Colture cellulari..... | 38 |
| 1.2. Trattamento laser..... | 38 |
| 1.3. Vitalità e proliferazione cellulare..... | 40 |
| 1.4. Analisi del ciclo cellulare..... | 40 |
| 1.5. Valutazione dell'apoptosi..... | 41 |
| 1.6. Saggio di clonogenicità..... | 42 |
| 1.7. Analisi statistica..... | 42 |
| 2. MATERIALI E METODI RELATIVI ALLO STUDIO SULL'APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL MUCOSITI ORALI..... | 43 |
| 2.1. Colture cellulari..... | 43 |
| 2.2. Colture fungine..... | 43 |
| 2.3. Trattamento laser..... | 44 |
| 2.4. Proliferazione delle cellule fungine..... | 44 |
| 2.5. Valutazione dell'apoptosi delle cellule fungine..... | 45 |
| 2.6. Isolamento di cellule dendritiche..... | 45 |
| 2.7. Saggio delle citochine..... | 46 |
| 2.8. Saggio dei Toll-like receptors..... | 46 |
| 2.9. Analisi statistica..... | 47 |

| | |
|---|----|
| 3. MATERIALI E METODI RELATIVI ALLO STUDIO SULLE APPLICAZIONI DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLA GENGIVOSTOMATITE FELINA..... | 47 |
| 3.1. Reclutamento dei soggetti e disegno dello studio clinico veterinario..... | 47 |
| 3.2. Trattamento laser..... | 48 |
| 3.3. Istologia..... | 48 |
| 3.4. Microscopia di immunofluorescenza..... | 49 |

Risultati

| | |
|---|----|
| 1. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL LINFEDEMA POST-MASTECTOMIA. Valutazione della sicurezza della radiazione laser su colture di cellule tumorali..... | 50 |
| 1.1. Valutazione della vitalità e proliferazione di cellule tumorali esposte al trattamento MLS..... | 51 |
| 1.2. Valutazione dell'apoptosi di cellule tumorali esposte al trattamento MLS..... | 52 |
| 1.3. Valutazione della progressione del ciclo cellulare di cellule tumorali esposte al trattamento MLS..... | 53 |
| 1.4. Valutazione della "cloning efficiency" di cellule tumorali esposte al trattamento MLS..... | 54 |
| 2. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Valutazione degli effetti del laser sulla sopravvivenza e sul potenziale infiammatorio di specie patogene coinvolte nella patogenesi delle mucositi orali..... | 55 |
| 2.1. Valutazione della capacità di <i>C. albicans</i> di formare colonie in conseguenza al trattamento MLS..... | 55 |
| 2.2. Valutazione della capacità di <i>Candida sp.</i> di formare colonie in conseguenza al trattamento MLS..... | 56 |
| 2.3. Valutazione dell'apoptosi di <i>Candida sp.</i> in conseguenza al trattamento MLS..... | 57 |
| 2.4. Valutazione del potenziale infiammatorio delle cellule fungine in conseguenza al trattamento MLS..... | 59 |
| 2.5. Valutazione della capacità delle cellule fungine di attivare i recettori di tipo Toll 2 e 4 in conseguenza al trattamento MLS..... | 60 |
| 3. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Valutazione dell'effetto del trattamento MLS sulla componente infiammatoria e sulla riparazione tissutale delle lesioni orali..... | 62 |
| 3.1. Analisi istologica..... | 62 |
| 3.2. Analisi di immunofluorescenza..... | 66 |

Discussione

1. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL LINFEDEMA POST-MASTECTOMIA. Discussione dei risultati sulla sicurezza della radiazione laser su colture di cellule tumorali.....67
2. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Discussione dei risultati sugli effetti del laser sulla sopravvivenza e sul potenziale infiammatorio di specie patogene coinvolte nella patogenesi delle mucositi orali.....74
3. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Discussione dei risultati sull'effetto antinfiammatorio e stimolante la riparazione dei tessuti della radiazione laser.....77

Conclusioni.....80

Bibliografia.....82

ABBREVIAZIONI

MLS: Multiwave Locked System

NIR: Near Infrared Radiation

Candida sp.: *Candida* species

PRRs: Pattern Recognition Receptors

PAMPs: Pathogen-associated Molecular Patterns

TLRs: Toll-like Receptors

CFU: Colony Forming Units

ROS: Reactive Oxygen Species

FGCS: Feline Chronic Gingivostomatitis

INTRODUZIONE

1. Patologie secondarie ai trattamenti oncologici

Con oltre 2,3 milioni di persone con una diagnosi di malattia oncologica nella loro vita, il tumore è a tutti gli effetti una patologia sociale di massa dagli effetti prolungati e con impatto rilevante, *in primis* sulle persone che ne sono colpite, non solo per via delle manifestazioni della malattia, ma anche relativamente alle conseguenze dei trattamenti atti a contrastarla.

I trattamenti per le malattie oncologiche producono, come avviene in tutte le cure, effetti indesiderati (o “collaterali”) che provocano al paziente disturbi di vario tipo e in generale un sensibile peggioramento della condizione di salute e della qualità di vita, già deteriorata dal tumore. Anche se gli effetti sono variabili da trattamento a trattamento e da paziente a paziente, quelli notoriamente più devastanti sono legati all’apparato gastrointestinale superiore (nausea e vomito) e la stragrande percentuale di pazienti riceve per tali sintomi terapie di supporto. Si presentano tuttavia, non di secondaria importanza, altri effetti tra i quali, la *fatigue*, la perdita di capelli, anoressia e complicazioni legate allo specifico intervento chirurgico per la resezione del tumore. Non sono poi da sottovalutare disturbi dell’umore e depressione. Parallelamente alle reazioni dell’organismo, infatti, la malattia oncologica influenza drasticamente la sfera psicologica del paziente, inducendolo ad uno shock emotivo che sollecita tutti gli aspetti della vita e provoca una serie di disturbi dell’umore e del comportamento che finiscono per debilitare ulteriormente il paziente.

Pertanto, raggiungere un’efficace gestione degli effetti collaterali provocati dai trattamenti antitumorali, attraverso lo sviluppo di nuove cure palliative e terapie di supporto, e porre la dovuta attenzione alla dimensione psicologica della persona che li riceve sono obiettivi strategici primari, il cui raggiungimento migliora la qualità della vita del paziente ed è in grado di produrre positive ricadute anche sui familiari e sul Sistema Sanitario Nazionale.

1.1. Il Linfedema post mastectomia

I progressi raggiunti negli ultimi venti anni nella gestione del cancro della mammella, a partire dal campo della diagnosi precoce fino al trattamento combinato tra chirurgia, chemioterapia e radioterapia, hanno migliorato sensibilmente in termini percentuali il controllo della malattia, riducendone la mortalità, prolungando significativamente i tassi di sopravvivenza delle pazienti e ridimensionando drasticamente la morbilità connessa, in particolare, alla terapia chirurgica. Tuttavia questi progressi non sono stati tali da debellare una delle complicazioni che maggiormente condizionano la qualità della vita delle pazienti dopo il trattamento, quale il linfedema secondario dell'arto superiore omolaterale alla sede della neoplasia maligna. Pertanto, nonostante la terapia chirurgica del cancro della mammella, grazie ad una diagnosi molto più precoce di un tempo, sia divenuta razionalmente e progressivamente sempre più conservativa, mentre, parallelamente, la radioterapia, dove necessaria, ha acquisito connotazioni tecniche di minore aggressività e di maggiore efficacia, il linfedema secondario registra, oggi, nella letteratura mondiale, un tasso di incidenza pari al 5-25%, con un incremento sino al 35% ed oltre, quando alla dissezione dei linfonodi ascellari segue la terapia radiante [Lee et al., 2008; Hayes et al., 2008].

Clinicamente, il linfedema è una malattia cronica causata da un difetto del sistema linfatico, progressiva e senza possibilità di cura definitiva [Golshan and Smith, 2006]. Questa condizione si verifica quando il sistema di trasporto linfatico scende al di sotto delle capacità necessarie per gestire i fluidi che normalmente fuoriescono dai vasi sanguigni nel sistema linfatico. L'accumulo di fluidi porta ad un rigonfiamento del tessuto sottocutaneo a causa dell'ostruzione dei vasi linfatici.

Come accennato precedentemente, in seguito all'intervento di resezione del carcinoma della mammella, viene molto spesso eseguita una linfoadenectomia ascellare a scopo di radicalità locale e stadiazione della malattia: questa ultima manovra, con l'ablazione dei linfonodi e con l'interruzione dei vasi costituisce un fattore predisponente alla stasi di linfa nel territorio a monte dei vasi linfatici. Altri fattori possono essere comunque responsabili: radioterapia, progressione ascellare o sopraclavere del carcinoma [Jung et al., 2014; Kim et al., 2013]. In questi casi il linfoedema può non presentarsi o essere latente, ma può invece precipitare in seguito a sopraggiunto aumento di produzione di

linfa: esercizio fisico eccessivo, stasi provocata (compressioni), ipertermia, flogosi. Inoltre, in seguito all'aumento del volume del liquido linfatico extra-vascolare, si osserva anche un aumento della pressione idrostatica a livello dei tessuti che si oppone al deflusso del sangue venoso, con un ulteriore riduzione del riassorbimento del liquido stesso da parte dei capillari venosi. Questi due fattori pressori, specie se sommati, sono responsabili del bilancio positivo dell'acqua tissutale.

La permanenza di linfa a livello dell'interstizio è responsabile diretta di una reazione flogistica cronica, lenta e subdola, che provoca un progressiva fibrosi in questo distretto: in fasi successive l'edema, da molle, tende a trasformarsi in linfedema duro; questa reazione, una volta innescata, prosegue in misura variabile anche quando lo stimolo che l'ha prodotta si attenua o scompare. Si comprende come se da una parte sia possibile rimuovere la linfa e trattare il linfedema nelle sue fasi precoci, dall'altra, anche se è rimossa la linfa, può permanere un certo turgore tissutale suscettibile a incrementarsi. [Guyton, 1986]

Come citato sopra, quando la comparsa del linfedema è causata da fattori esterni, quali interventi di chirurgia oncologica per l'asportazione di uno o più linfonodi, viene definito linfedema secondario. Il linfedema di tipo primario è invece dovuto ad una displasia linfatica congenita ed insorge senza una causa apparente in età molto variabile [International Society of Lymphology, 2003].

Dal punto di vista sintomatologico, circa il 50% delle pazienti affette da linfedema riferisce dolore, senso di pesantezza nell'arto interessato e ristretta mobilità della spalla [Armer et al., 2003; Fu et al., 2013]. Quest'ultimo effetto compromette drasticamente qualsiasi movimento e promuove la riduzione delle capacità lavorative del soggetto affetto. Tenendo conto dei sintomi, risulta ovvio che il linfedema abbia un impatto fortemente negativo sulla qualità di vita dei pazienti portando, in alcuni casi, a sindromi depressive [McWayne and Heiney, 2005].

Per il linfedema non esiste una cura definitiva. Tuttavia i pazienti affetti devono comunque seguire un preciso programma terapeutico, per ridurre l'edema e migliorare i disturbi funzionali determinati dalla patologia.

Sulla base di criteri clinici e diagnostici il linfedema viene studiato su quattro livelli. Lo stadio I o stadio pre-clinico è caratterizzato dalla presenza di alterazioni delle vie linfatiche ma dall'assenza di edema. Nello stadio successivo l'edema è persistente e

regredisce solo in parte con la posizione declive ed il riposo notturno. Nel III e IV stadio, si osserva una situazione di edema persistente, senza possibilità di regressione spontanea, che degenera in una vera e propria elefantiasi con deformazione dell'arto e scomparsa della normale distinzione delle sue componenti anatomiche.

Tra le principali indagini che permettono di fare una diagnosi del linfedema, la linfo-scintigrafia è un esame di primaria importanza. La conferma della natura linfo-statica, l'individuazione della causa (da ostacolo o da reflusso), l'estensione della malattia, la compromissione del circolo linfatico profondo rispetto a quello superficiale sono solo alcune delle valutazioni che questo esame permette di fare. Consente, inoltre, di individuare lo stadio I della linfo-stasi, ancora clinicamente non manifesta, svolgendo così un ruolo fondamentale nella prevenzione del linfedema secondario [Sundaram and Subramaniam, 2013; Kramer, 2004].

Sebbene la linfo-scintigrafia sia l'esame di prima scelta per la definizione del linfedema, ci sono altre indagini per la diagnosi, come ad esempio la linfo-angi-RM, l'Eco-color-Doppler e la linfo-grafia.

Una volta individuato il quadro clinico e definito lo stadio della malattia, il paziente può sottoporsi a varie metodologie di cura. Le terapie più efficaci sono quelle decongestive, che utilizzano diverse tecniche: il linfo-drenaggio manuale, il bendaggio compressivo accompagnato da ginnastica e la pressoterapia pneumatica [Badger et al., 2000; Szuba et al., 2000; Dini et al., 2000; Rodrick et al., 2014].

Il linfo-drenaggio manuale è una tecnica fisioterapica diffusa, che mira a favorire il drenaggio della linfa dall'arto colpito attraverso vie linfatiche collaterali: si tratta di un massaggio che interessa prevalentemente la porzione superficiale dell'arto e che tende a far muovere la linfa verso la porzione prossimale, seguendo la fisiologica direzione del drenaggio linfatico [Szuba et al., 2000]. Le prime regioni ad essere massaggiate sono quelle prossimali in modo da svuotare i linfatici di queste zone ed evitare gli accumuli di linfa che si avrebbero se si tentasse di svuotare prima le zone distali. Solitamente il linfo-drenaggio è molto efficace nel ridurre il linfedema, tanto che in alcuni casi anche dopo una sola seduta se ne può apprezzare una riduzione. Pur essendo efficace nell'immediato, un limite del linfo-drenaggio è quello di apportare un beneficio solo temporaneo. Infatti, se non viene applicato un bendaggio elastocompressivo, entro poco tempo tornano ad accumularsi liquidi portati dal flusso sanguigno.

Il bendaggio è un trattamento che può essere complementare al linfodrenaggio oppure essere utilizzato in prima battuta, soprattutto quando il linfedema è di dimensioni ridotte [Badger et al., 2000]. Il bendaggio rappresenta una metodica di facile gestione, previa adeguata preparazione dell'operatore e sicuramente, rispetto ad altre metodiche, garantisce risultati duraturi a breve e lungo termine, evitando ripetute e sconcertanti recidive. Dopo pochi giorni di applicazione del bendaggio si potrà assistere ad un netto decremento dell'edema per poi transitare gradualmente nella fase successiva, consistente nella conservazione dei risultati raggiunti con l'utilizzo dell'indumento elastico definitivo.

Un presupposto fondamentale è la conoscenza base della fisiopatologia del bendaggio ipo-elastico, con le relative componenti intrinseche di manifattura sia delle bende che delle calze, unitamente ai principi emodinamici sulle strutture anatomiche sottoposte a compressione. Particolare importanza va riservata alla dimostrazione pratica dell'arte di bendare, poichè questa metodica più di ogni altra è caratterizzata dalla componente manuale e dalla corretta applicazione e sorveglianza nel tempo delle bende. Va sottolineato, però, che oltre agli evidenti vantaggi anche per questa pratica esistono dei limiti e complicanze dovute ad un errata applicazione delle bende sull'arto.

Un'altra tecnica per il trattamento del linfedema è la compressione pneumatica, una tecnica che viene effettuata mediante un dispositivo costituito da dei manicotti contenenti più camere pneumatiche gonfiate alternativamente. La compressione pneumatica simula passivamente, ossia in assenza di attività muscolare, la fase diastolica e sistolica della circolazione linfovenosa [Dini et al., 1998]. Gli apparecchi di pressoterapia sono costituiti da sacche gonfiabili, parzialmente sovrapposte tra loro, che vengono applicate su varie parti del corpo e collegate ad un motorino pompante. Il gonfiaggio dei comparti avviene in sequenza, comprimendo l'arto edematoso in direzione prossimale.

Le pressioni esercitate dal sistema (fase sistolica) variano dai 40 ai 120 mm Hg, a seconda delle caratteristiche dell'edema, con una durata di 30-40 sec. ed un intervallo tra un'onda pressoria e l'altra (pausa diastolica) di 20 sec.

Questa metodica determina uno spostamento meccanico sia dei liquidi dall'interstizio intercellulare verso il comparto circolatorio sia verso altri distretti intercellulari (che

saranno trattati secondo le procedure sopra descritte) ottenendo in tempi rapidi risultati soddisfacenti sia sotto il profilo funzionale che estetico.

Naturalmente la metodica va utilizzata con l'integrazione tecnica del linfodrenaggio mediante manovre di preparazione e svuotamento dei pacchetti linfonodali.

Una volta concluso il ciclo di trattamento con il linfodrenaggio, bendaggio o pressoterapia è necessario istituire una terapia di mantenimento, che viene effettuata tramite l'applicazione di guaine elastiche sull'arto affetto.

1.2. Le mucositi orali

La mucosite del cavo orale è una complicazione che colpisce approssimativamente il 35-40% dei pazienti che ricevono chemio-radioterapia, ma la sua frequenza può essere più alta nei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche [Elting et al., 2003]. La mucosite è il risultato degli effetti sistemici degli agenti citotossici chemioterapici e degli effetti locali delle radiazioni sulla mucosa orale. L'infiammazione della bocca si manifesta inizialmente con eritema della mucosa e sensazione di bruciore e successivamente con comparsa di ulcerazioni. Soggettivamente i pazienti lamentano dolore anche molto severo, incapacità ad alimentarsi, bere, deglutire ed anche parlare. In casi estremi e fortunatamente rari la severa ostruzione a livello faringeo, causata dall'edema e dalla formazione di "pseudomembrane infiammatorie", può richiedere una tracheotomia d'urgenza. Il danno mucoso si può estendere dal cavo orale al faringe e all'intero tratto gastro-intestinale. Inoltre la rottura della barriera mucosa dovuta alle ulcerazioni è un fattore di rischio per infezioni secondarie (batteriche, fungine e virali) che, nel paziente neutropenico come quello ematologico o sottoposto a trapianto di cellule staminali emopoietiche, possono diventare sistemiche e mettere a rischio la vita [Gabriel et al., 2003].

Numerosi fattori influenzano l'estensione e la severità della mucosite: farmaci utilizzati, dosi, modalità, via e frequenza di somministrazione, tollerabilità individuale [Epstein & Schubert, 2003]. Agenti chemioterapici DNA ciclo-specifici (come bleomicina, cisplatino, 5FU, metotrexate) sono più stomatotossici di quelli non fase specifici [Peterson & Schubert, 2001]. Inoltre certi farmaci che vengono secreti nella saliva

(metotrexate, etoposide) aumentano in tal modo la loro tossicità sulle mucose. Tra i farmaci quelli più frequentemente associati a mucosite sono: citosina arabinoside, doxorubicina, etoposide, 5FU, metotrexate. La presenza di patologie preesistenti del cavo orale sembra aumentare il rischio di mucosite indotta da chemioterapia. Condizioni dentali come malattia periodontale, carie, scarsa igiene orale sono associate ad un aumentato rischio di stomato-tossicità. Trattamenti radianti su capo e collo inducono un aumentato rischio di mucosite alterando direttamente la mucosa orale e altre strutture come le ghiandole salivari e l'osso. Altri fattori legati al paziente sono età (i pazienti giovani sembrano essere a più alto rischio per l'elevata proliferazione dell'epitelio), decadimento delle condizioni generali, patologia di base, conta dei neutrofili.

Per "misurare" l'entità del fenomeno nei diversi contesti di cura, la letteratura ha proposto, nel corso degli ultimi trent'anni, un ampio ventaglio di scale. La più utilizzata a livello mondiale è quella della World Health Organization (WHO) messa a punto alla fine degli anni '70. È una scala tuttora molto valida per le sue caratteristiche di semplicità, riproducibilità ed applicabilità nei molteplici contesti. Alla base vi è un punteggio (score) numerico che va da 0 a 4 sulla base di elementi oggettivabili, come il rossore e la presenza di ulcerazioni mucose, ed elementi funzionali (capacità di assumere cibi solidi e liquidi). Tale metodica favorisce la raccolta di dati sull'incidenza, la severità e la durata media del fenomeno consentendo agli operatori sanitari di continuare a sviluppare protocolli e percorsi assistenziali quanto più adeguati alle necessità di cura dei pazienti.

Il meccanismo patobiologico alla base del danno della mucosa orale è complesso [Sonis et al., 2004]. Sono stati individuati alcuni stadi per riassumerlo: 1) Inizio: la chemio-radio terapia danneggia il DNA, sia con meccanismo diretto che attraverso la formazione di ROS (reactive oxygen species). 2) Produzione di molecole segnale: il danno iniziale attiva la trascrizione di NF-kB, che a sua volta induce la produzione di citochine pro-infiammatorie. 3) Amplificazione del segnale: le citochine pro-infiammatorie si accumulano e danneggiano i tessuti direttamente e indirettamente. Questa fase precede la mucosite clinica. 4) Ulcerazione: perdita della integrità mucosa con comparsa di lesioni clinicamente dolenti e possibilità di colonizzazione batterica, fungina o infezione virale. 5) Guarigione: la cicatrizzazione inizia quando l'insulto è superato e (nel paziente ematologico) quando si risolve la neutropenia.

Il quarto stadio del meccanismo descritto rappresenta una fase molto critica per l'andamento della patologia. Le infezioni batteriche, fungine o virali vanno ad ostacolare il normale processo di guarigione, debilitare ulteriormente i pazienti e compromettere il programmato svolgimento delle loro terapie. In circa il 40% dei casi alla mucosite orale si associa un'infezione sostenuta da miceti appartenenti al genere *Candida*. Classicamente tali miceti sono definiti patogeni opportunisti e possono provocare infezioni localizzate alla cute o alle mucose ma anche infezioni viscerali o disseminate. Tra le specie di *Candida* coinvolte nelle infezioni orofaringee, *Candida albicans* è l'agente eziologico più frequente [Williams et al., 2011]. Recentemente, soprattutto per il largo uso della profilassi anti-micotica a largo spettro, sono emersi anche altri ceppi patogeni, come le specie *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, resistenti ai più comuni farmaci anti-micotici [Silva et al., 2011]. Inoltre, è stato osservato che tutte le specie di *Candida* coinvolte hanno una particolare tendenza a formare biofilm, un modello di aggregazione che conferisce alle singole cellule protezione dal continuo lavaggio operato dalla saliva e previene la penetrazione di molecole e cellule del sistema immunitario oltre che dei farmaci antimicotici [Williams et al., 2011]. Considerata la frequenza di tali infezioni, in particolare nei soggetti neoplastici, e gli effetti devastanti sullo stato nutrizionale e psico-fisico dei pazienti, è sempre più attuale la ricerca di nuovi trattamenti che incidano o sulle capacità proliferative delle specie patogene o sui meccanismi di difesa del sistema immunitario dell'ospite.

Tentando di fare luce su questi meccanismi di difesa, è noto che il riconoscimento di *Candida spp.* da parte delle cellule del sistema immunitario è mediato da "Pattern Recognition Receptors" (PRRs), che includono i recettori di tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) e le lectine di tipo C ed S. Questi recettori sono principalmente espressi dalle cellule dell'immunità innata come macrofagi, cellule dendritiche, monociti, neutrofili e la loro attivazione induce vie di segnalazione molecolari che portano alla sintesi di citochine infiammatorie e citochine in grado di orientare una risposta immune specifica e specializzata nell'eliminazione dei microrganismi. Nelle infezioni fungine, le cellule dell'immunità innata vengono inizialmente allertate da componenti della parete fungina riconosciuti come "non self", come i mannani e i β -glucani. In genere, lo strato più esterno della parete, composto da mannoproteine altamente glicosilate con N- e O- glicani, è il primo ad essere riconosciuto da recettori per i mannani (MR, Dectin-2), allertati da N-

glicani, e da TLR4, allertato da O-glicani. Il processo iniziale di riconoscimento della parete fungina induce anche l'esposizione dello strato più interno, composto da chitina e β 1-3, β 1-6 glucani, che vengono riconosciuti da Dectin 1 in cooperazione con TLR2 [Netea and Marodi, 2010]. Altri PRRs coinvolti nel riconoscimento delle strutture fungine sono DC-SIGN (mannosio altamente ramificato), Galectin 3 (β 1-2 glucano) e TLR9 (oligonucleotidi CPG non metilati) [Netea and Marodi, 2010]. L'attivazione simultanea di diversi recettori da parte dei differenti componenti della parete fungina induce la produzione di citochine da parte delle cellule dendritiche e macrofagi, con conseguente attivazione di cellule T effettrici di tipo T helper (Th) 1 che, attraverso la produzione di IFN γ e il sostegno alle cellule B per la produzione di anticorpi opsonizzanti, diventano protagonisti essenziali della difesa dell'organismo contro l'infezione. In particolari condizioni, le cellule fungine inducono la differenziazione di cellule effettrici Th17, che producono IL-17, una citochina estremamente attiva nel mobilitare i granulociti neutrofili e nell'indurre la produzione di defensine. I linfociti Th17, inoltre, svolgono una importante funzione regolatrice nel promuovere risposte di tipo Th1, limitando contemporaneamente risposte inefficaci di tipo Th2 [Romani, 2011]. In questo scenario, ottimale per l'eradicazione dell'infezione fungina, bisogna altresì inserire i molteplici meccanismi che i funghi patogeni hanno sviluppato per evadere le difese dell'ospite. Tra questi, i più importanti sono rappresentati da: a) la variazione della composizione della parete fungina in relazione al morfotipo (ifa o lievito), lo stato di crescita e le condizioni ambientali [Rizzetto et al., 2010]; tali variazioni, modificando la capacità di attivare i diversi recettori, possono influenzare la risposta immunitaria specifica [Romani, 2011]. Ad esempio, i β 1-3 glucani, maggiori attivatori di TLR2/Dectin-1, sono esposti nei lieviti gemmanti di *C. albicans* ma vengono mascherati allo stato di ifa. Nelle cellule dendritiche, *C.albicans* attiva un programma tolerogenico, che induce l'attivazione di cellule T regolatorie (Treg), linfociti specializzati nell'inibizione delle risposte immunitarie specifiche ed infiammatorie [Romani, 2011].

Visto l'importante impatto che la mucosite orale può avere per il paziente, è fondamentale cercare di prevenirla con ogni mezzo; attualmente sono disponibili numerosi interventi, ma nessuno di loro è stato validato in modo definitivo. Purtroppo nella maggior parte dei casi si tratta di cure palliative per contenere il dolore e terapie di supporto volte al controllo dei sintomi. Questi trattamenti prevedono protocolli di cura orale, interventi per

minimizzare la tossicità sulla mucosa data dai chemioterapici, somministrazione di anestetici locali, antibatterici, antifungini e antivirali, protettori della mucosa e antidolorifici.

Quando il dolore è talmente severo da richiedere un'analgesia sistemica, la morfina rimane il farmaco oppioide di prima scelta per la sua efficacia e facile gestione ed è l'unico vero sistema per controllare in parte il dolore. Nei pazienti con mucosite di grado 4 si ricorre talvolta anche a nutrizione parentale, in quanto è totalmente compromessa la capacità di alimentarsi.

2. La Laserterapia

2.1.Cenni storici e principi fisici del laser

Il termine “LASER” è l’acronimo di “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, ovvero amplificazione della luce mediante emissione stimolata di radiazioni; dalla sua prima elaborazione a oggi, questa tecnologia ha trovato un campo sempre più vasto di applicazioni.

L’importanza della luce nello sviluppo dei processi biologici era nota fin dall’antichità e i bagni di sole cui si sottoponevano gli antichi Egizi ne sono la prova più evidente. La possibilità di concentrare la luce e di sfruttarla, in modo potenziato, per scopi diversi, fu intuìta agli inizi del secolo scorso, grazie alle teorie di Albert Einstein. Ma dobbiamo attendere il 1960 per vedere il primo apparecchio laser al rubino prodotto da Theodore Maiman negli Stati Uniti. Nei decenni successivi, sulla scia del prototipo originale di Maiman, i laser cominciarono a essere utilizzati con successo in ambito prima chirurgico e poi medico, tanto che intorno agli anni ’70 venne introdotto il concetto di laserterapia. Il laser è l’ultimo ed il più avanzato tipo di sorgente luminosa oggi a nostra disposizione. Lo sviluppo della tecnologia e il miglioramento delle conoscenze degli effetti della luce sull’organismo, ha portato i laser a essere attualmente una delle forme di terapia fisica più diffuse.

Il laser non è, tuttavia, un “oggetto magico e misterioso”, che viene ritenuto capace di poter curare tutto o, al contrario, incapace di produrre risultati realmente efficaci, come talvolta sostengono scettici o detrattori. Diversi fattori hanno contribuito ad alimentare questi erronei giudizi:

1. Una letteratura non sempre rigorosa dal punto di vista scientifico: troppo spesso le pubblicazioni sugli effetti del laser o sulla laser-terapia riportano descrizioni vaghe sui protocolli e sui parametri utilizzati (lunghezza d’onda, potenza, fluência, etc.....).
2. Una scarsa conoscenza, da parte degli operatori, della fotobiologia e degli effetti biologici del laser.
3. L’inappropriata applicazione della laser terapia a causa di errori diagnostici.

4. Una scarsa conoscenza dei processi molecolari e cellulari che sono alla base degli effetti sistemici della laser terapia.
5. Una scarsa conoscenza delle corrette modalità di applicazione della laser-terapia, delle caratteristiche dello strumento usato, delle norme di sicurezza.

Tutti questi fattori sono responsabili della comparsa di risultati contrastanti o poco convincenti, del mancato ottenimento degli effetti terapeutici o, addirittura, della possibilità di produrre effetti dannosi.

La radiazione generata dai laser possiede alcune proprietà che si possono sintetizzare in: monocromaticità, coerenza, collimazione.

MONOCROMATICITA': la luce prodotta da un laser è di un unico colore (monocromatica); la maggior parte delle radiazioni emesse dagli apparecchi laser sono circoscritte intorno ad una singola lunghezza d'onda, con una larghezza di banda molto stretta. Di contro, la luce generata da altre sorgenti comprende un'enorme varietà di lunghezze d'onda, che spaziano in alcuni casi dall'ultravioletto all'infrarosso, ottenendo come risultante la percezione del colore bianco quando la luce colpisce la retina dell'osservatore. La lunghezza d'onda rappresenta un fattore determinante nella definizione degli effetti terapeutici prodotti da una terapia laser, poichè questo parametro determina quali specifici recettori (biomolecole) andranno ad assorbire la radiazione incidente, e quindi quali interazioni foto-biologiche si renderanno responsabili dell'efficacia di quel determinato trattamento.

COLLIMAZIONE: nella luce laser, i raggi di luce (fotoni) prodotti dall'apparecchio sono paralleli, con minima divergenza della radiazione per tutto il suo percorso. Questa proprietà fa sì che tutta la potenza ottica emessa dall'apparecchio venga mantenuta circoscritta in un'area limitata, anche a distanza e, in certa misura, anche dopo il passaggio della radiazione attraverso i tessuti.

COERENZA: il raggio di luce emesso da un laser è sempre in "fase", cioè le onde della luce emessa si accordano perfettamente nel tempo (coerenza temporale) e nello spazio (coerenza spaziale).

Il funzionamento del laser si basa sull'emissione stimolata di radiazione da parte degli atomi di un'opportuna sostanza, detta materiale attivo. Gli atomi vengono dapprima

“eccitati”, ovvero portati ad un livello energetico superiore, mediante una sorgente energetica esterna (pompaggio), quindi vengono “stimolati” ad emettere l'energia immagazzinata per mezzo di una radiazione esterna di frequenza determinata.

Se l'emissione del fotone avviene senza che l'atomo sia stimolato da forze esterne, si parla di emissione spontanea. Il fotone spontaneo viene emesso in una qualsiasi direzione e la sua energia (frequenza) è distribuita su una banda spettrale di una certa larghezza (riga, non monocromatica). Sono sorgenti di fotoni emessi spontaneamente le normali lampade (incandescenza, a scarica, a fluorescenza, i led etc).

Si ha emissione stimolata quando l'atomo nel livello eccitato emette un fotone identico al fotone incidente e si porta nel livello inferiore. Il processo è stimolato dal fotone incidente. La direzione e la frequenza del fotone emesso sono identiche a quelle del fotone incidente. Assorbimento e emissione stimolata hanno la stessa probabilità di occorrenza.

Normalmente la luce che attraversa un materiale viene assorbita dal materiale stesso man mano che avanza, cioè cede potenza agli atomi che incontra, eccitandoli, ovvero portandoli ad uno stato energetico più alto. Se però si interviene eccitando gli atomi del materiale con una fonte di energia esterna, secondo l'analisi di Einstein, le probabilità che avvengano l'emissione stimolata e l'assorbimento sono date dalla percentuale di atomi eccitati a fronte della percentuale di atomi nello stato energetico base. Se ci sono più atomi eccitati che atomi nello stato energetico base, la luce che attraversa il materiale guadagnerà fotoni attraverso il meccanismo dell'emissione stimolata da parte degli atomi, invece di essere assorbita dagli stessi.

L'amplificazione della luce avviene mediante successivi passaggi dei fotoni attraverso il materiale attivo, ottenuti per riflessione dei fotoni stessi da parte di due specchi opportunamente orientati, che formano la cosiddetta cavità ottica. Durante il percorso fra uno specchio e l'altro, i fotoni inducono altri atomi eccitati a tornare allo stato fondamentale, con l'emissione di fotoni caratterizzati dalla medesima frequenza e direzione dei fotoni incidenti, generando quindi un fascio di fotoni monocromatico e collimato, di alta intensità. Parte di questa radiazione viene poi estratta dalla cavità ottica attraverso uno dei due specchi, reso semitrasparente.

2.2.L'interazione laser-tessuto

Lo studio dell'interazione laser-tessuti si basa sulla conoscenza del mezzo in cui la luce si propaga, e quindi sull'assorbimento e la trasmissione della radiazione. La tipologia dell'interazione cambia notevolmente al variare dei parametri del dispositivo laser ed in base alle modalità di conversione dell'energia della radiazione a livello biomolecolare.

Quando la luce colpisce la superficie di un tessuto biologico circa il 3% di essa viene riflesso a causa del cambiamento dell'indice di rifrazione tra aria e tessuto. La parte rimanente si propaga all'interno del tessuto: in parte viene assorbita, in parte diffusa (scattering).

L'assorbimento dell'energia luminosa è indispensabile perché si verifichi un effetto a livello del tessuto. Se i fenomeni di scattering sono trascurabili rispetto alla capacità di assorbimento del tessuto, la luce laser rimane fortemente collimata e la lunghezza di estinzione $L_{\text{estinzione}}$ (ovvero la profondità alla quale l'intensità del fascio risulta ridotta a circa 1/3 del valore iniziale), è funzione del solo coefficiente di assorbimento. Indicando con $I(x)$ l'intensità che si propaga nel tessuto biologico, l'attenuazione della luce laser nel tessuto è espressa dalla legge di Lambert-Beer:

$$I(x) = I_0 \exp[-\alpha(\lambda)x]$$

dove $\alpha(\lambda)$ indica il coefficiente di assorbimento del tessuto alla lunghezza d'onda λ e x la penetrazione nel tessuto. La lunghezza di estinzione è data da $L_{\text{estinzione}} = 1/\alpha(\lambda)$. Il coefficiente di assorbimento dipende dal tipo e dalla quantità di cromofori presenti nel tessuto. I cromofori sono le molecole responsabili dell'assorbimento della radiazione ottica e della colorazione del tessuto; la loro composizione, che varia a seconda del tipo di tessuto, determina la risposta del tessuto stesso alla radiazione laser caratterizzata da una certa lunghezza d'onda. Il cromoforo presente in quantità maggiore nei tessuti biologici è l'acqua, che costituisce il 70% circa della massa corporea totale. L'acqua è praticamente trasparente alla luce visibile, mentre assorbe fortemente nell'infrarosso. Il rimanente 30% di massa tissutale è costituito essenzialmente da composti organici: proteine, grassi, zuccheri, acidi nucleici. Alcune di queste molecole assorbono in parte

nel visibile, dando però luogo a considerevoli fenomeni di scattering. Per poterle efficacemente eccitare si sfrutta quindi, normalmente, l'elevato assorbimento nell'ultravioletto dei legami organici. Le lunghezze d'onda del visibile vengono principalmente assorbite da pigmenti specifici del tessuto, quali ad esempio l'emoglobina nei globuli rossi e la rodopsina nella retina.

Alle lunghezze d'onda in cui l'assorbimento del tessuto è molto piccolo, la propagazione della radiazione ottica è dominata dal processo di diffusione o scattering. Il fotone ha, quindi, bassa probabilità di essere assorbito, mentre risulta elevata quella di essere deflesso dalla sua direzione iniziale. La traiettoria del fotone è un cammino a zig-zag, che può essere modellizzato con opportune tecniche di simulazione. Un fascio collimato perde, pertanto, la propria collimazione con la penetrazione nel tessuto e i fotoni diffondono in zone anche sensibilmente lontane da quella incidente. Lo scattering è dominante nelle regioni spettrali a basso assorbimento, ovvero, nel caso dei tessuti, nel lontano visibile e primo infrarosso.

In base alla lunghezza d'onda della radiazione laser, all'intensità erogata ed alla durata dell'esposizione, si possono distinguere diverse tipologie di interazione: fotochimica, fototermica e fotomeccanica.

2.2.1. L'interazione fotochimica

Si verifica quando l'energia assorbita (o parte di essa) viene utilizzata per i) un riarrangiamento conformazionale o strutturale della molecola; ii) la formazione di una nuova specie; iii) il trasferimento ad altra molecola, che, a sua volta, reagisce non termicamente con le molecole del mezzo.

L'interazione fotochimica è più selettiva di quella fototermica e fotomeccanica perchè è dovuta alla presenza nel tessuto di cromofori endogeni (sostanze normalmente presenti nei tessuti, come ad esempio molecole contenenti anelli porfirinici) o esogeni (molecole somministrate/immesse nei tessuti dall'esterno, come il rosa bengala ed il cardiogrin).

La reazione fotodinamica coinvolge la molecola che assorbe il fotone (fotosensibilizzatore) ed una molecola di ossigeno: il fotosensibilizzatore, una volta

eccitato, trasferisce la propria energia all'ossigeno, che si porta dallo stato fondamentale a bassa reattività in uno stato eccitato ad elevata affinità elettronica, nel quale è in grado di produrre reazioni di ossidazione con altre molecole presenti nel mezzo biologico. A livello tissutale le reazioni fotochimiche sono il primo passo nel complesso processo fotobiologico che conduce a possibili effetti utili o nocivi nei tessuti irradiati.

Importanti conseguenze dell'interazione fotochimica sono rappresentate dalle reazioni che favoriscono l'attivazione enzimatica, l'incremento della sintesi di acidi nucleici e proteine, nonché il turnover metabolico. Negli strati cutanei e sottocutanei, la radiazione laser viene, per esempio, assorbita da cromofori presenti a livello mitocondriale, metabolicamente attivi. Elementi chiave della catena ossidativa, come i citocromi, i coenzimi nicotinici e le flavoproteine, sono coinvolti insieme ad altre molecole. È stato ipotizzato che il cambiamento della conformazione stereochimica, indotto dal campo magnetico generato dalla radiazione laser, porti ad un incremento del metabolismo energetico cellulare, con un aumento della concentrazione di ATP [Mochizuki-Oda et al., 2002; Kujawa et al., 2004; Oron et al., 2007]. L'aumentata produzione di ATP si traduce in una maggior quantità di energia disponibile a livello cellulare che, in caso di danni provocati da processi infiammatori e degenerativi o da eventi traumatici, facilita il recupero sia morfologico che funzionale. Tra gli effetti biologici principali imputabili a meccanismi fotochimici, è riportata la capacità di ottimizzare le funzioni della pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ a livello della membrana cellulare, l'aumentata sintesi proteica e il significativo innalzamento del numero di mitosi. La chiusura dei canali di membrana per il potassio, causata da modificazioni delle lipoproteine superficiali, sembra essere l'evento responsabile dell'iperpolarizzazione della membrana nelle fibre nervose. Questo fenomeno provoca l'innalzamento della soglia di eccitabilità dei recettori del dolore. Pertanto, i processi biochimici sembrano avere una parte importante negli effetti antinfiammatorio, antiedemigeno, antalgico e biostimolante che si attribuiscono alla radiazione laser.

2.2.2. L'interazione fototermica

A livello molecolare la reazione fototermica avviene a seguito dell'assorbimento di fotoni da parte delle molecole bersaglio, che si portano in uno stato elettronico-vibrazionale eccitato, e del successivo trasferimento collisionale dell'energia alle molecole del mezzo, con aumento della loro energia cinetica. Questo processo di decadimento non radiativo avviene in tempi estremamente brevi (1-100 ps) e la conseguente rapida termalizzazione produce un aumento della temperatura locale. A livello tissutale l'entità degli effetti biologici del calore è in gran parte controllata dall'assorbimento da parte delle molecole bersaglio, essenzialmente acqua, emoproteine, pigmenti (quali melanina, carotenoidi, flavine, bilirubina), ed altre molecole, come acidi nucleici ed altri composti contenenti anelli aromatici. L'evoluzione della temperatura nel tempo dipende dalla modalità con cui l'energia laser è depositata nel tessuto, in particolare dalla densità di energia rilasciata nell'unità di tempo, dalla durata dell'esposizione e, se la sorgente è pulsata, dalla durata dell'impulso e dalla quantità di energia per impulso. Il riscaldamento progressivo del tessuto produce una sequenza complessa di effetti biologici, che a livello macroscopico possono essere classificati secondo differenti processi termodinamici a cui corrispondono le principali modificazioni istologiche.

Per temperature comprese tra 43 e 45 °C (regime ipertermico) l'effetto è la denaturazione (rottura dei legami idrogeno) delle biomolecole e dei loro aggregati (proteine, collagene, lipidi, emoglobina). Nell'intorno di 45 °C si osservano cambiamenti conformazionali, rotture di legami, alterazioni delle membrane cellulari.

Per temperature superiori a quella di denaturazione, hanno luogo processi di necrosi (cellulare) coagulativa e di vacuolizzazione. Tra 50 e 60°C vengono modificate (ridotte) le attività enzimatiche, e ha inizio una cospicua denaturazione delle macromolecole (quali proteine, collagene, lipidi, emoglobina), che è alla base del processo di coagulazione. Importante è la denaturazione del collagene, proteina fibrosa largamente diffusa nei mammiferi, composta da quattro catene polipeptidiche unite a formare una struttura bielicica. L'aumento di temperatura distrugge l'organizzazione spaziale delle catene macromolecolari, le spire si distribuiscono in modo casuale, producendo una vistosa contrazione strutturale delle fibre di collagene. La denaturazione termica, la contrazione delle proteine intercellulari ed un possibile collasso del citoscheletro producono

alterazioni e riduzione di volume delle cellule coagulate. Le alterazioni e la perdita di integrità delle membrane sono i tipi di danno predominanti in ogni tipologia di cellula che risulta danneggiata per effetto termico. Infine, nei tessuti ove esiste a livello cellulare un elevato ordine spaziale (come ad esempio nel tessuto muscolare), origine in genere di proprietà di birifrangenza ottica, la denaturazione proteica sconvolge questa struttura regolare, con perdita delle relative proprietà ottiche.

A temperatura medio-alta ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) gli effetti sono essenzialmente dominati dalla presenza di acqua. In seguito ad irraggiamento continuo, l'acqua presente nelle cellule evapora e la temperatura tissutale aumenta rapidamente e porta ad una serie di reazioni che terminano con la carbonizzazione del tessuto.

Un parametro importante per caratterizzare l'interazione fototermica è il tempo di rilassamento termico del tessuto. Attualmente i laser ad alta potenza, una volta utilizzati solo in chirurgia a causa dell'alta potenza trasferita al tessuto, vengono utilizzati in campo bio-medico e fisiatico. Il problema dell'eccessiva energia trasmessa ai tessuti ed il possibile danno conseguente sono stati risolti costruendo dispositivi che permettono a questi laser tempi di irradiazione brevissimi ed una pausa tra un impulso e l'altro sufficientemente lunga da permettere il raffreddamento del tessuto ed evitare un sommarsi di fenomeni termici che potrebbe produrre un effetto fototermico eccessivo e quindi un danno.

Come la stimolazione fotochimica, anche quella fototermica causa effetti significativi, che si manifestano in modo significativo a livello circolatorio, ma non solo. L'aumento controllato della temperatura comporta una intensa azione sul microcircolo. L'attivazione del microcircolo favorisce un maggior apporto nutritivo ed un miglior drenaggio di cataboliti dai tessuti.

2.2.3. L'interazione fotomeccanica

L'interazione fotomeccanica è un processo molto complesso, prodotto dall'assorbimento di un impulso laser di elevata potenza di picco. E' caratterizzato dalla formazione di onde acustiche, anche molto intense (onde d'urto), che si propagano con la medesima direzione e verso dell'impulso che le ha generate, ed anche dalla rimozione di tessuto (ablazione).

L'ablazione laser avviene secondo vari canali e dipende dalle condizioni e dai parametri d'irraggiamento, come pure dal complesso delle proprietà ottiche, termiche, meccaniche e chimiche del tessuto. In tutti i casi di tessuti abbastanza omogenei, l'ablazione può essere caratterizzata da una cosiddetta "soglia di ablazione" che rappresenta il livello d'irraggiamento minimo al di sopra del quale si produce rimozione. Questo parametro, fondamentale per l'analisi fenomenologica dei processi di ablazione, è generalmente espresso tramite la fluena laser (energia/unità di superficie, J/cm^2), anche per i regimi indotti da elevate potenze laser, il cui innesco ed evoluzione è più strettamente legato all'intensità (W/cm^2).

Il processo fotoablativo è fortemente dipendente dalla presenza di acqua (l'energia per innalzare la temperatura dell'acqua a $100^\circ C$ è circa $2500 J/cm^3$) e viene differenziato nei due regimi i) regime sotto soglia di vaporizzazione, ii) regime sopra soglia di vaporizzazione.

Per durate dell'impulso laser dell'ordine di 1-10 ns e a basse energie laser per impulso, l'energia depositata nel volume di tessuto non è sufficiente a vaporizzarne una frazione significativa durante il tempo d'irraggiamento; il volume irraggiato è comunque soggetto a un forte gradiente di pressione, particolarmente alto all'interfaccia con il tessuto. Il picco del gradiente è più precisamente localizzato in vicinanza dello strato superficiale del tessuto e, se il valore di picco della pressione supera la resistenza del tessuto stesso, una certa frazione della massa irraggiata viene eiettata in maniera impulsiva. Per intensità laser sufficientemente elevate e durate dell'impulso laser molto brevi, in prossimità della superficie irraggiata si ha la ionizzazione del materiale, con formazione di plasma (insieme di elettroni e ioni positivi).

Per intensità laser medio-alte e durate dell'impulso laser intermedie (1-100 ns), il processo di interazione laser-tessuto è dominato dalla vaporizzazione dell'acqua. La rimozione di tessuto avviene tramite un processo di vaporizzazione estremamente rapida, con caratteristiche di natura esplosiva su scala microscopica, e rappresenta uno dei processi primari di ablazione laser impiegati nelle tecniche chirurgiche per la rimozione precisa e controllata di tessuto molle, in particolar modo quando sia importante minimizzare gli effetti collaterali di natura termica. L'impulso laser trasferisce in tempi molto brevi l'energia necessaria alla vaporizzazione del tessuto, provocando una estremamente rapida

e violenta eiezione di materiale dalla superficie. I danni termici sono generalmente trascurabili perché l'energia trasferita allo strato di tessuto irraggiato viene quasi integralmente impiegata per la vaporizzazione dello stesso e, in ogni caso, non vengono interessati termicamente gli strati sottostanti, poiché il processo si conclude in tempi brevi rispetto al tempo di propagazione del calore. I danni fotomeccanici non sono del tutto trascurabili: alla fotoablazione è necessariamente associato un processo meccanico di generazione di onde d'urto, che possono produrre danni indesiderati alle strutture anatomiche (come ad esempio a livello retinico nella fotochirurgia refrattiva oculare). Tuttavia, se opportunamente controllata e mantenuta decisamente sotto la soglia del danno, è proprio la generazione di queste onde d'urto che può costituire uno stimolo positivo per l'omeostasi dei tessuti.

L'interazione fotomeccanica secondaria, o indiretta, è indotta quando una modificazione fototermica del microambiente, dovuta all'assorbimento di impulsi laser di durata relativamente lunga, genera deformazioni meccaniche convogliate a livello cellulare attraverso la rete di proteine filamentose della matrice extracellulare e del citoscheletro. In pratica, le modificazioni della matrice extracellulare indotte dal calore possono dare luogo a stress meccanici sulla componente cellulare del tessuto [Thomsen, 1991]. I processi fototermici prodotti da laser con impulsi relativamente lunghi ($\tau > 1\mu\text{s}$) possono indurre modificazioni nell'architettura delle fibre costituite da collagene ed altre macromolecole, così come transitori fenomeni fluidodinamici nel mezzo liquido in cui sono disperse. Conseguentemente si verifica una deformazione del microambiente extracellulare che, alla fine, applica uno stress meccanico alle cellule. E' noto che le forze meccaniche possono modulare l'espressione genica e quindi la morfologia e le funzioni cellulari [Rossi et al., 2010; Monici & Cialdai, 2012].

All'interazione fotomeccanica sono attribuiti anche altri importanti effetti biologici, quali un'accelerazione della peristalsi linfatica, che facilita l'assorbimento di liquidi interstiziali e la riduzione degli edemi di origine flogistica e post-traumatica, e la riattivazione del microcircolo, determinando un aumento dell'ossigenazione e del drenaggio linfatico.

2.3. Effetti della laser terapia a livello sistemico: effetto antinfiammatorio, antiedemigeno, analgesico e stimolante i processi di riparazione

La letteratura è ricchissima di studi sugli effetti terapeutici dei laser. Sebbene non tutti questi studi siano stati condotti con il dovuto rigore scientifico, vi sono alcuni effetti che sono stati dimostrati e riportati da moltissimi autori. L'effetto anti-infiammatorio e anti-edemigeno è assai noto: il laser è in grado di influenzare i meccanismi dell'infiammazione e della flogosi a vari livelli. In clinica è stato rilevato che la somministrazione di laserterapia porta ad una diminuzione della sintomatologia dell'infiammazione avvertita direttamente dal paziente [Vladimirov., et al. 2004; Kandolf-Sekulovic., 2003]. Inoltre, l'iperemia generata dal trattamento, aumentando il calibro dei vasi capillari e linfatici, ha effetto sulla distribuzione delle sostanze proinfiammatorie nei tessuti e sulla loro rimozione, oltre a garantire un maggior apporto di ossigeno e di sostanze nutritive ai tessuti lesi. Jang e collaboratori hanno tabulato in una recente meta-analisi studi clinici riguardanti numerose e importanti patologie articolari trattate con terapia laser (λ comprese tra 785 e 1064 nm, dosi comprese tra 3 e 40 J/cm²), analizzandone i risultati e discutendo approfonditamente sulla correlazione tra i parametri utilizzati, dosi energetiche somministrate ed efficacia riscontrata [Jang, 2012]. Gli autori hanno concluso che la laserterapia, se applicata con dosi adeguate, esercita un effetto benefico sul dolore in molte patologie articolari, rappresentando una valida alternativa ai farmaci antinfiammatori (FANS). In uno studio del 2009 dove veniva utilizzata una radiazione laser infrarossa per trattare l'osteoartrite del ginocchio, gli autori hanno riportato, oltre a significativi miglioramenti per quanto riguarda il dolore e la capacità flessoria del ginocchio, un leggero incremento termico dei tessuti trattati, misurato mediante analisi termografiche. La stimolazione del microcircolo locale che segue a questo incremento potrebbe contribuire, secondo gli autori, a spiegare l'effetto antinfiammatorio del laser nel trattamento delle patologie articolari, in cui la componente infiammatoria gioca un ruolo molto importante [Hegedus et al., 2009]. L'azione sul microcircolo unitamente a quella sui vasi linfatici e sull'organizzazione e permeabilità dell'endotelio [Baratto et al., 2010] risulta essere anche tra i meccanismi responsabili dell'effetto antiedemigeno. L'efficacia della laser terapia nel trattamento dell'edema dovuto a varie cause (trauma, infiammazione, intervento chirurgico) è conosciuta da lungo tempo ed è confermata da

recenti studi [Albertini et al., 2007; Radwan et al., 2010, Abreu et al., 2010, de Moraes et al., 2010]. Per quanto riguarda i meccanismi che stanno alla base dell'effetto anti-infiammatorio, risultati più esaurienti sono stati trovati negli studi in vitro ed in vivo. In uno studio effettuato su muscolo gastrocnemio di ratto, gli autori hanno osservato che la radiazione laser infrarossa riduce la risposta infiammatoria e blocca gli effetti dati dal rilascio di ROS (reactive oxygen species) in un modello di lesione traumatica. Gli effetti inibitori sull'attività di NF-kB, sull'espressione di iNOS e sulla produzione di collagene ha portato gli autori a concludere che il laser può attenuare alcune delle conseguenze negative dell'infiammazione e della fibrosi e ottimizzare la guarigione del muscolo [Rizzi et al., 2006]. Anche in uno studio del 2010 di Servetto e collaboratori è stato dimostrato che il trattamento laser infrarosso comporta una significativa modulazione dei marker infiammatori. In un modello di miopatia, indotta nel ratto mediante infiltrazione di adrenalina, gli autori hanno osservato che il laser induce un decremento dei livelli di fibrinogeno, L-citrullina e dell'attività della superossido dismutasi, riportandoli a valori simili al controllo [Servetto et al., 2010]. Un interessante risultato sui meccanismi molecolari alla base dell'effetto antinfiammatorio del laser è stato ottenuto in uno studio di Monici e collaboratori: l'analisi proteomica condotta su cellule muscolari ha dimostrato che il trattamento laser infrarosso induce un aumento della proteina antinfiammatoria NLRP10. Questa inibisce l'attività della caspasi 1 e del complesso proteico PYCARD, che promuovono la maturazione delle citochine infiammatorie interleuchina 1- β (IL-1 β) ed interleuchina 18 (IL-18). Perciò, in ultima analisi, NLRP10 inibisce la produzione delle interleuchine pro-infiammatorie IL-1 β e IL-18, riducendo l'infiammazione [Monici et al., 2013].

L'azione antinfiammatoria ed antiedemigena elimina in molti casi la principale causa della sensazione dolorifica. Il moderato riscaldamento svolge un'azione miorilassante ed elasticizzante sui tessuti muscolo-tendinei e connettivi, che si traduce in una diminuzione della percezione dei sintomi dolorifici. Inoltre, la radiazione laser può interferire con la conduzione del segnale a livello periferico. In un lavoro di Jimbo e collaboratori, ad esempio, è stato descritto un blocco del potenziale d'azione nelle fibre nervose superficiali in seguito a trattamento con un laser a diodi Ga-Al-As ($\lambda=830$ nm, 16.2 mW), [Jimbo K. et al., 1998]. Inoltre, l'iperemia generata dalla radiazione laser promuove il drenaggio delle sostanze algogene, eliminando a monte le cause della sensazione

dolorifica [Navratil L. et al., 2001; Ferreira D.M. et al., 2005]. E' inoltre descritto l'innalzamento della soglia del dolore, che si ipotizza sia in parte dovuto ad una riduzione della permeabilità della membrana plasmatica allo ione potassio ed in parte alla stimolazione endorfinica del sistema nervoso centrale [Svensson P. et al., 1991]. Altri autori hanno dimostrato che il trattamento laser induce un incremento nella produzione di sostanze morfino-mimetiche, note per la loro attività analgesica [Hagiwara et al 2007]. Infine, è attribuito al laser un effetto stimolante che favorisce i processi di riparazione e rigenerazione dei tessuti. A questo effetto di stimolazione contribuiscono vari fattori. La vasodilatazione aumenta l'apporto di nutrienti e di fattori di crescita, tra i quali l'FGF, fattore di attivazione dei fibroblasti, e promotore dell'angiogenesi [Hudlicka. et al. 1992; Deveci et al. 2002]. L'attivazione dei fibroblasti determina un incremento della sintesi di collagene, essenziale nella riparazione e rigenerazione dei tessuti, [Almeida-Lopes L. et al., 2001; Liu H. et al., 2008;]. La neoangiogenesi è processo indispensabile per assicurare l'apporto di ossigeno e sostanze nutritive ai nuovi tessuti ed è fortemente correlata al recupero muscolare [Hudlicka, et al 1992; Deveci, et al. 2002]. Nel ratto è stato dimostrato che in seguito a stimolazione con un laser a diodi Ga-Al-As ($\lambda=830$ nm) nella regione superficiale del muscolo gastrocnemio, i livelli di FGF aumentano significativamente rispetto a quelli del muscolo non trattato [Jiro Nakano., et al. 2009]. In un processo biologico lento e complesso come la rigenerazione tissutale, effetti come l'aumento dei fattori di crescita, la promozione dell'angiogenesi, la modulazione dell'infiammazione hanno una notevole importanza in quanto partecipano al recupero del tessuto leso favorendo e regolando la cicatrizzazione. Alla base dell'effetto stimolante della radiazione laser è da evidenziare anche l'aumento della produzione di ATP da parte dei mitocondri [Mochizuki-Oda N. et al., 2002; Kujawa J. Et al., 2004; Oron U. et al., 2007]. In seguito a trattamento con laser He-Ne ($\lambda=632$ nm) si è osservato nei mitocondri isolati l'aumento del potenziale di membrana e conseguente produzione di ATP [Passarella et al., 1984]. In un modello di lesione al muscolo gastrocnemio del ratto, è stato dimostrato che la stimolazione con laser infrarosso induce un incremento dell'attività metabolica nei tessuti trattati rispetto al controllo. In particolare è stato osservato un significativo incremento dell'attività della succinato deidrogenasi e dei complessi I, II, II, IV della catena respiratoria mitocondriale [Silveira et al., 2009]. Inoltre è ben nota la capacità di alcuni laser di promuovere la proliferazione cellulare [Karu T.,

1991; Tuby H. et al., 2007; Almeida Lopes L. et al., 2001; Moore P. et al., 2005; Chen C.H. et al, 2008]. Alla luce di questi risultati, il recupero dei tessuti lesi può essere accelerato tramite opportune applicazioni di laserterapia. In letteratura sono riportati anche molti studi che dimostrano gli effetti della radiazione laser sull'omeostasi del muscolo e sui meccanismi di riparazione in questo tessuto. Vari autori hanno rilevato un aumento della proliferazione delle cellule satellite nel muscolo [Weiss and Oron, 1992; Bibikova et al. 1994; Amaral et al. 2001]. Queste cellule hanno lo scopo di formare nuove fibre e sostituire quelle che sono andate incontro a necrosi [Bischoff and Heintz, 1994]. Normalmente quiescenti possono essere attivate da fattori rilasciati dalle cellule del muscolo infortunato [Bischoff, 1986; Bischoff and Heintz, 1994; Kawiak J., et al. 2006]. In alcuni studi, è stato dimostrato che un sistema laser che combina due lunghezze d'onda nell'infrarosso influenza la miogenesi e la produzione di matrice, la produzione di proteine contrattili ed il loro passaggio da una isoforma all'altra, la produzione di proteine che legano l'ATP e di sostanze che modulano l'evoluzione del processo infiammatorio [Vignali et al., 2011; Monici et al., 2013]. Questi ed altri meccanismi, su cui il laser ha un effetto positivo, sono presumibilmente alla base dei risultati ottenuti in clinica. Sono presenti, infatti, diversi studi che riportano effetti positivi del laser nel prevenire l'insorgenza della fatica muscolare, accelerare i tempi di recupero ed in generale migliorare la funzionalità del tessuto muscolare [Leal Junior et al 2009 a e b; de Almeida et al 2012; Galanti et al., 2012 e 2013].

3. Applicazione della laserterapia nelle patologie secondarie ai trattamenti oncologici

3.1.Linfedema post-mastectomia

Da ormai diversi anni la laserterapia viene applicata per trattare patologie secondarie che insorgono nei pazienti oncologici in seguito ad interventi chirurgici, radio e chemioterapia. In effetti vi sono numerosi studi che dimostrano l'efficacia della laserterapia nel trattamento del linfedema post-mastectomia [Carati et al., 2003; Ahmed Omar et al., 2011; Konanoglu et al., 2009; Dirincan et al., 2009] e della mucosite orale [Abramoff et al., 2008; Carvalho et al., 2011; Bensodoun et al., 1996; Maiya et al., 2006; Jaguar et al., 2007].

Negli studi di Carati e Omar, i risultati ottenuti hanno evidenziato una significativa riduzione del volume dell'arto interessato [Carati et al., 2003; Ahmed Omar et al., 2011] così come dei liquidi extracellulari e della resistenza tissutale [Carati et al., 2003], misurati rispettivamente mediante analisi di impedenza bioelettrica e tonometria. È stato inoltre osservato un miglioramento nella mobilità della spalla e della forza di presa della mano [Ahmed Omar et al., 2011]. In entrambi gli studi, il trattamento veniva effettuato con un laser a 904 nm di lunghezza d'onda e con una dose di 1.5 J/cm² e consisteva nell'irraggiare da 10 a 17 punti distribuiti nell'area interessata. I risultati ottenuti in questi studi rimanevano significativi per 2/3 mesi dalla fine del trattamento. [Carati et al., 2003; Ahmed Omar et al., 2011].

In uno studio del 2009, Kozanoglu e collaboratori mettono a confronto l'efficacia della compressione pneumatica, una terapia standard utilizzata per il trattamento del linfedema post mastectomia, e la laserterapia. Utilizzando gli stessi parametri strumentali dei due lavori precedenti ($\lambda=904$ nm 1.5 J/cm²), gli autori hanno osservato che entrambe le terapie comportano una riduzione del volume dell'arto interessato, sia a fine del ciclo di trattamenti che a 3 e 6 mesi di follow up, ma il miglioramento è maggiore nel gruppo di pazienti trattati con il laser. A 12 mesi dalla fine del trattamento, gli effetti positivi ottenuti, in termini di riduzione di dolore e della sensazione di gonfiore, sono significativi soltanto nel gruppo trattato con il laser [Kozanoglu et al., 2009].

In uno studio precedente, effettuato con modalità di trattamento differenti (laser con doppia lunghezza d'onda e più alta dose somministrata) [Piller et al., 1995], gli autori avevano già evidenziato l'efficacia della terapia laser nel ridurre significativamente i fluidi extracellulari ed il volume dell'arto interessato, così come nel migliorare il dolore e la sensazione di gonfiore e pesantezza. A due anni di follow-up la riduzione del volume dell'arto e i valori della tonometria rimangono molto simili a quelli di fine trattamento [Piller et al., 1998].

I risultati ottenuti nel lavoro di Dirican del 2009 sono assai rilevanti. In questo studio clinico, dove 17 pazienti affette da linfedema venivano trattate con laser infrarosso ($\lambda=904$), si aveva una riduzione del volume dell'arto pari al 73% e del dolore pari al 40%. Inoltre 14 delle pazienti hanno riferito un forte miglioramento nella mobilità della spalla [Dirican et al., 2009].

Sulla base di questi e di altri studi [Kaviani et al., 2011; Lau and Cheing, 2009; Ridner et al., 2013] la laserterapia è stata proposta come terapia alternativa nel trattamento del linfedema post-mastectomia. D'altra parte, l'efficacia della laserterapia nel trattamento dell'edema di diversa causa (trauma, infiammazione e chirurgia) è conosciuta da tempo e dimostrata da recenti studi citati nel capitolo precedente [Albertini et al., 2007; Radwan et al., 2010; Abreu et al., 2010, de Moraes et al., 2010; Ahmed Omar 2011].

3.2.Mucositi orali

Recentemente, la terapia laser è stata applicata anche nel trattamento delle mucositi orali dando ottimi risultati sulla riduzione dei sintomi. Il confronto tra questi studi è piuttosto difficile da fare in quanto non esistono protocolli di trattamento standardizzati e le sorgenti laser ed i parametri utilizzati sono assai eterogenei. Tuttavia l'efficacia del trattamento laser nella riparazione dei tessuti e sul dolore è, anche in questo caso, ben nota e dimostrata da recenti studi già precedentemente citati [[Hawkins-Evans and Abrahamse, 2008; Gungormus and Akyol, 2009; Prado et al., 2006; Hagiwara et al., 2007; Ferreira et al., 2005].

In uno studio pilota del 2008, Abramoff e collaboratori hanno valutato l'efficacia della laserterapia nella prevenzione e nel trattamento di mucositi orali indotte da chemioterapia

in pazienti pediatrici. Utilizzando una radiazione laser nel rosso, hanno dimostrato una marcata diminuzione del dolore, misurato mediante scala VAS (visual analoge scale) e un abbassamento dei livelli di severità della patologia, anche nel caso di pazienti affetti da grave granulocitopenia [Abramoff et al., 2008]. Anche altri studi, in cui è stato utilizzato un laser He-Ne ($\lambda= 632 \text{ nm}$) riportano evidenze sulla riduzione del dolore e su un generale miglioramento della sintomatologia [Carvalho et al., 2011; Bensodoum et al., 1996; Maiya et al., 2006]. Inoltre, nel lavoro di Carvalho, dove il trattamento laser veniva effettuato prima di ogni seduta di radioterapia, è stato dimostrato un effetto del laser nel ritardare la comparsa delle mucositi [Carvalho et al., 2011].

Risultati simili sono stati ottenuti anche in studi effettuati con sorgenti che emettono radiazioni caratterizzate da lunghezze d'onda nell'infrarosso [Jaguar et al., 2007; Chermetz et al., 2014]. Nello studio di Jaguar e collaboratori è stata investigata l'efficacia clinica del laser nel prevenire e ridurre la mucosite orale di pazienti che erano stati sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche. In accordo con gli studi precedenti, gli autori hanno evidenziato una marcata diminuzione del dolore e riduzione del grado della malattia ed hanno inoltre dimostrato una minore necessità di somministrare morfina ai pazienti [Jaguar et al., 2007]. Anche in uno studio molto recente, su pazienti pediatrici, è stata dimostrata l'efficacia di un laser infrarosso nel trattamento della mucosite provocata da chemioterapia. Già in seguito a pochi trattamenti i pazienti hanno riferito un importante riduzione del dolore e a fine trattamento è stata dimostrata, in tutti i pazienti trattati, la totale regressione delle lesioni [Chermetz., 2014]. Sempre in un studio clinico del 2014, gli autori hanno investigato sul ruolo della laserterapia nel miglioramento dello stato nutrizionale dei pazienti affetti da mucositi orali causate da radioterapia. Le mucositi orali, come descritto in precedenza, comportano gravi difficoltà nella deglutizione, nella masticazione e in generale sono associate a condizioni debilitanti per i pazienti. Per questi ed altri motivi, è abbastanza frequente che, in seguito alle terapie oncologiche (radioterapia, chemioterapia e chirurgia), i pazienti subiscano una grave perdita di peso. In seguito al trattamento laser gli autori hanno osservato una minore diminuzione della massa corporea ed hanno correlato questo dato in modo indiretto con l'azione del laser. Gli effetti sulla guarigione delle lesioni e sulla riduzione del dolore dati dal laser portano ad un miglioramento delle capacità di masticazione e deglutizione e influenzano profondamente la capacità di alimentazione dei

pazienti. Perciò, gli autori hanno concluso correlando la laserterapia con il migliore stato nutrizionale dei pazienti [Gobbo et al., 2014].

Per queste evidenze ed altre presenti in letteratura, l'Associazione Multinazionale delle cure di supporto nel cancro (MASCC) e la Società Internazionale di Oncologia Orale (ISOO) hanno sostenuto l'utilizzo della laserterapia nella prevenzione e nella gestione delle mucositi orale.

4. Descrizione e scopo della ricerca

Il progetto di ricerca, portato avanti in questi tre anni di dottorato, prevedeva uno studio sulle applicazioni del trattamento laser nella gestione di patologie che frequentemente insorgono in conseguenza a terapie oncologiche. Essendo il linfedema post-mastectomia e le mucositi orali due patologie secondarie del paziente oncologico in cui l'applicazione del laser è di grande interesse ed è già stata oggetto di alcuni studi clinici, di fatto il progetto di ricerca sviluppato nel corso del dottorato si è costituito di due sotto-progetti, dedicati appunto all'applicazione della laser terapia nella gestione delle suddette patologie. Nella prima delle due linee di ricerca, quella dedicata al linfedema post-mastectomia, lo studio si è focalizzato su un aspetto molto importante da considerare nel caso la terapia laser sia rivolta ad un paziente oncologico. Anche se ci sono numerose evidenze in favore dell'applicazione della laserterapia nel trattamento del linfedema post-mastectomia, la sicurezza di questo trattamento rappresenta un questione molto delicata. Sebbene il laser venga ad oggi largamente utilizzato nelle complicazioni conseguenti alle terapie oncologiche, la comunità scientifica non ha ancora sufficienti conoscenze riguardo agli effetti della radiazione laser sulle cellule tumorali: in altre parole non sappiamo se la laserterapia può interferire con la progressione della malattia oncologica. In letteratura vi sono molti studi in cui si riporta che la radiazione laser favorisce la proliferazione di cellule tumorali [Pinheiro et al., 2002; Sroka et al., 1999], molti altri in cui non si osserva aumento di proliferazione [Powell et al., 2010] ed altri ancora in cui si riporta addirittura un aumento di apoptosi delle cellule tumorali [Wang et al., 2005; Wu et al., 2009]. Recentemente, Schartinger e collaboratori hanno studiato la diversa risposta alla radiazione laser data da colture di fibroblasti, cellule epiteliali non neoplastiche e cellule di carcinoma orale (SCC-25), al fine di valutare la sicurezza della terapia se

applicata nel trattamento delle mucositi orali post-chemio o radioterapia. I risultati hanno dimostrato, in seguito a trattamento laser, un'aumentata proliferazione nei fibroblasti, che risulta al contrario diminuita nelle cellule epiteliali non neoplastiche e nelle cellule di carcinoma orale (SCC-25). Inoltre, è stato osservato nelle cellule di carcinoma orale un effetto proapoptotico dato dal laser. Pertanto, gli autori hanno escluso che il laser abbia un ruolo nel promuovere la crescita tumorale [Schartinger et al., 2011]. Tuttavia, studi precedenti hanno riportato che il trattamento effettuato con laser nel rosso aumenta significativamente la proliferazione di cellule di carcinoma della laringe (Ep H 2) [Pinheiro et al., 2002].

Molti altri studi sull'effetto della radiazione laser nelle cellule tumorali presentano risultati contrastanti [Frigo et al., 2009; Powell et al., 2010]. La discordanza dei risultati dipende probabilmente dalle differenti condizioni sperimentali: sorgenti laser di diverso tipo, differenti parametri di trattamento, cellule tumorali di differente origine e tipologia.

Proprio a causa di questa grande eterogeneità è necessario che l'uso della laserterapia nei pazienti oncologici sia preceduto da studi indirizzati alla specifica applicazione, dove viene valutata, in appropriati modelli sperimentali, la sicurezza e l'efficacia del trattamento laser che verrà poi utilizzato nel paziente.

La parte del progetto di dottorato dedicata all'applicazione della laserterapia nel trattamento del linfedema post mastectomia si è concentrata su uno studio, *in vitro*, della sicurezza di un sistema laser infrarosso. Come modelli sperimentali sono state scelte due linee cellulari di adenocarcinoma della mammella, oltre ad una coltura di fibroblasti dermici usati come controllo non tumorale. Nello studio sono stati analizzati i principali processi biologici che caratterizzano il comportamento cellulare, quali la vitalità e la proliferazione, l'apoptosi, la progressione del ciclo cellulare e la cloning efficiency ovvero la capacità delle cellule di formare colonie.

La seconda parte di progetto, quella dedicata dell'applicazione della laserterapia nelle mucositi orali, si è concentrata sulla valutazione degli effetti del laser su un aspetto importante che molto spesso caratterizza le mucositi orali: le infezioni fungine. In seguito ai trattamenti oncologici, la mucosa della bocca è soggetta a delle alterazioni che non gli permettono di mantenere la sua funzione di protezione. Questo si traduce in una maggiore

predisposizione alle infezioni batteriche, fungine o virali. La comparsa di lesioni ulcerative nella mucosa rappresenta la nicchia ecologica ottimale per la crescita di microrganismi patogeni. Dobbiamo poi ricordare che queste pazienti, proprio a causa della malattia oncologica, sono altamente immunocompromessi. Il processo infiammatorio indotto da funghi patogeni peggiora notevolmente la sintomatologia clinica e ostacola fortemente il normale processo di guarigione. Inoltre, contribuisce a debilitare ulteriormente i pazienti e compromettere il programmato svolgimento delle loro terapie. Tra i microrganismi patogeni coinvolti nelle infezioni orofaringee, *Candida albicans* è l'agente eziologico più frequente [Williams et al., 2011]. Recentemente, soprattutto per il largo uso della profilassi anti-micotica a largo spettro, sono emersi anche altri ceppi patogeni, come le specie *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, resistenti ai più comuni farmaci anti-micotici [Silva et al., 2011]. Inoltre, è stato osservato che tutte le specie di *Candida* coinvolte hanno una particolare tendenza a formare biofilm, un modello di aggregazione che conferisce alle singole cellule protezione dal continuo lavaggio operato dalla saliva e previene la penetrazione di molecole e cellule del sistema immunitario oltre che dei farmaci antimicotici [Williams et al., 2011].

Recenti studi hanno dimostrato che radiazioni nel vicino infrarosso (NIR) emesse da sorgenti laser avanzate, basate sulla combinazione di due lunghezze d'onda, hanno proprietà fotoinattivanti nei confronti di batteri e funghi patogeni [Bornstein et al., 2009]. L'efficacia della laserterapia nelle infezioni orofaringee è stata confermata da vari studi clinici riportati nel capitolo precedente [Lino et al., 2011; Bjordal et al., 2011]. Tuttavia rimangono quasi del tutto sconosciuti i meccanismi cellulari e molecolari che stanno alla base degli effetti terapeutici osservati a livello sistemico. Pertanto sono necessari studi volti a comprendere gli effetti della radiazione laser infrarossa sui funghi patogeni e sulla risposta immunitaria dell'organismo ospite, modificata anche a causa delle alterazioni prodotte dal trattamento laser sui microrganismi stessi, con conseguente alterazione delle proprietà immunogene. Tali studi assumono importanza basilare per definire i presupposti scientifici di future applicazioni cliniche, che dovranno essere sempre più mirate, specifiche e sicure, date anche le problematiche del paziente oncologico che è particolarmente soggetto alle infezioni del cavo oro-faringeo.

Lo scopo del progetto è stato studiare l'effetto prodotto da trattamenti effettuati con un sistema laser nell'infrarosso su cellule di *Candida sp.* più frequentemente coinvolte nella patogenesi della candidosi oro-faringea (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) sia in

termini di modificazione delle proprietà proliferative delle cellule fungine, sia in termini di modificazione delle proprietà immunogene, che facilitano l'eliminazione dell'agente patogeno da parte delle cellule del sistema immunitario.

Nella parte di progetto dedicata dell'applicazione della laserterapia nelle mucositi orali, è stato inoltre effettuato uno studio sugli effetti del laser sulla componente infiammatoria e sui processi di riparazione tissutale. In letteratura ci sono numerosi studi, alcuni dei quali citati nel capitolo precedente, dove viene dimostrato un ruolo della laserterapia nel favorire la riparazione tissutale e accelerare la guarigione delle ferite [Hawkins-Evans and Abrahamse, 2008; Marques et al., 2005; Gungormus and Akyol, 2009; Silveira et al., 2007; Prado et al., 2006]. Gli stessi studi sull'efficacia del laser nel trattamento delle mucositi orali presentano dati che sono un'ulteriore conferma dell'effetto positivo del laser nella rigenerazione dei tessuti lesi [Abramoff et al., 2008; Carvalho et al., 2011; Bensodoun et al., 1996; Maiya et al., 2006; Jaguar et al., 2007]. Infatti, in molti studi viene dimostrato una regressione delle lesioni e una riduzione del grado della malattia. Anche se i meccanismi molecolari e cellulari non sono del tutto noti, sulla base di studi in vitro e su modelli animali è stata avanzata l'ipotesi che la laserterapia possa favorire la riparazione tissutale controllando la risposta infiammatoria ed il comportamento dei fibroblasti, incrementando la sintesi di collagene e riattivando il microcircolo.

Per indagare su questa ipotesi, è stato effettuato, in collaborazione con un medico veterinario, uno studio in cui la laserterapia è stata applicata su gatti affetti da gengivostomatite cronica felina (FGCS). È stato scelto di utilizzare animali affetti da FGCS in quanto, questa patologia, che può essere anche molto severa, rappresenta un ottimo modello per lo studio degli effetti del laser sulla componente infiammatoria e sui processi riparativi delle mucositi orali.

La gengivostomatite cronica felina (FCGS) è una infiammazione cronica persistente della mucosa orale e della gengiva, che colpisce comunemente i gatti adulti [Lyon 2005; Camy et al., 2010]. La malattia si presenta con quadri clinici estremamente variabili, tutti però accumulati dalla difficoltà ad alimentarsi. I gatti colpiti da questa patologia presentano lesioni infiammatorie, ulcerative e/o proliferative, soprattutto a carico delle gengive e della mucosa buccale. Spesso c'è una forte infiammazione, focale o diffusa, nella porzione più profonda del cavo orale (denominata faucite), a livello della lingua e della

mucosa delle guance. L'eziologia di questa patologia non è ancora certa, possiamo riconoscere vari agenti eziologici che, sia singolarmente o in combinazione, possono creare l'infiammazione. Tra questi, batteri della placca, virus (calicivirus, virus della leucemia felina, virus dell'immunodeficienza felina), infezione da *Bartonella henselae* [Lommer and Vestraete., 2003; Hardy et al., 2002; Lyon, 2005].

Per quanto concerne la cura di questa malattia, sono state utilizzate numerose terapie mediche (es. antibiotici, cortisonici, interferone, ciclosporine ecc), tuttavia ad oggi, non è ancora possibile individuare un'unica terapia efficace e duratura. La riduzione della carica batterica presente nel cavo orale, abbassando lo stimolo infiammatorio, rimane uno dei punti basilari del trattamento. La terapia chirurgica, che si basa sull'estrazione dei denti dell'animale, rappresenta infatti uno dei metodi terapeutici maggiormente efficaci.

Lo scopo di questa parte del progetto è stato studiare l'effetto di trattamenti effettuati con un sistema laser nell'infrarosso su casi di gengivostomatite cronica felina, adottati nello studio come modello di lesione a carico del cavo orale. In particolare, è stata condotta un'analisi istologica ed un'analisi mediante tecniche di immunofluorescenza su campioni biopsici prelevati nell'area della lesione ad inizio e fine trattamento. Le analisi si sono concentrate sulla valutazione di alcuni parametri, indicativi dello stato infiammatorio del tessuto, come la presenza di linfociti e plasmacellule, e sull'osservazione delle modificazioni a carico dell'epitelio. Parallelamente, per avere un quadro clinico generale dell'animale, sono stati raccolti una serie di dati riguardanti alcuni dei comportamenti fondamentali dell'animale.

Riassumendo, il progetto di dottorato si è concentrato sulla valutazione della possibile applicazione della laser nel trattamento del linfedema post-mastectomia e delle mucositi orali. In particolare, sono stati approfonditi degli aspetti del trattamento laser nelle patologie secondarie ai trattamenti oncologici, che hanno portato di fatto allo svolgimento di tre studi diversi. Il primo, effettuato su linee cellulari derivanti da adenocarcinoma della mammella, si è focalizzato sulla valutazione della sicurezza del trattamento laser nelle cellule tumorali. Nel secondo studio, si è valutata l'influenza del trattamento laser sulla sopravvivenza ed il potenziale infiammatorio di *Candida sp.* specie fungine principalmente coinvolte nella patogenesi delle mucositi orali. L'ultimo studio è stato

dedicato alla valutazione gli effetti del laser sulla componente infiammatoria e sui processi di riparazione delle lesioni orali.

MATERIALI E METODI

1. MATERIALI E METODI RELATIVI ALLO STUDIO SULL'APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL LINFEDEMA POST-MASTECTOMIA.

1.1. Colture cellulari

La coltura primaria di fibroblasti dermici (gentilmente donata dal Dr. Mocali del Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche dell'Università di Firenze) deriva da biopsia cutanea prelevata nell'arto superiore di una donatrice sana, previo consenso informato. Le linee cellulari MCF-7 e MDA-MB361 (gentilmente donate dal Dr. Normanno della INT-Fondazione Pascale di Napoli) sono derivanti da adenocarcinoma della mammella. In dettaglio, la linea MCF-7 si origina da effusione pleurica mentre la linea MBA-MD361 da metastasi cerebrale.

Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) addizionato di antibiotici (penicillina 0.59 g/l; streptomina 1g/l), glutammina (2mM) e siero fetale bovino al 10%. Le cellule sono state mantenute a 37 °C in incubatore con atmosfera costituita per il 5% da CO₂, per mantenere il pH tra 7.3-7.5.

1.2. Trattamento laser

I trattamenti sono stati effettuati utilizzando un sistema laser MLS (Multiwave Laser System, ASA srl). Questo apparecchio viene largamente utilizzato in clinica e la sua tecnologia è stata approvata dalla FDA statunitense (Food and Drugs Administration). MLS è un laser di classe IV ed è costituito da due sorgenti (diodi laser) sincronizzate. I due diodi hanno diversa lunghezza d'onda, potenza di picco e modalità di emissione. Il primo ha una modalità di emissione pulsata con lunghezza d'onda $\lambda=904\text{nm}$ e potenza di picco 25W; ogni impulso è in realtà formato da un treno di impulsi (larghezza del singolo impulso 100 ns, massima frequenza di ripetizione 90 kHz). La frequenza dei treni di impulsi può essere impostata nell'intervallo 1-2000 Hz, variando di conseguenza la

potenza media rilasciata; l'altro diodo ha lunghezza d'onda $\lambda=808\text{nm}$ e doppia modalità di emissione: continua o frequenzata, sincronizzata rispetto alla radiazione pulsata. La frequenza degli impulsi può variare da 1 a 2000 Hz, con potenza media fino a 1.1 W.

Per effettuare il trattamento, le cellule sono state mantenute in sospensione o lasciate aderire nei pozzetti di un multiwell da 24. In particolare, sono state utilizzati i pozzetti della prima e della terza linea orizzontale della piastra, gli altri sono stati riempiti con inserti di cartoncino nero per evitare la diffusione e riflessione della luce.

Per l'irraggiamento, la piastra è stata posta all'interno di un supporto appositamente progettato per consentire un trattamento a scansione e garantire la riproducibilità in tutti gli esperimenti. La piastra è allineata con il manipolo, il quale viene fatto scorrere su un binario sovrastante il supporto, di dimensioni tali da assicurare una scansione omogenea sull'intera fila di pozzetti della piastra. Il manipolo è posto a 2 cm di distanza dal fondo dei pozzetti, in modo che lo spot dei due diodi laser sovrapposti, che investe perpendicolarmente la superficie del campione, abbia lo stesso diametro del pozzetto (13 mm). Tutti i trattamenti sono stati effettuati dal medesimo operatore. La scansione dei campioni è stata eseguita manualmente, muovendo il manipolo con una velocità di 5,6 cm/s grazie all'utilizzo di un metronomo.

Abbiamo scelto di utilizzare una modalità di trattamento a scansione in modo da avvicinarsi il più possibile alle condizioni di trattamento utilizzate in clinica.

Per l'esposizione, le cellule (fibroblasti dermici, MCF-7 e MDA-MB361) sono state piastrate 24h prima dell'esperimento alla concentrazione di 5×10^3 cellule/pozzetto. Il protocollo prevedeva un trattamento giornaliero di 10 min con una frequenza di 1500Hz ed una densità di energia di 27 J/cm^2 . Il trattamento è stato ripetuto per 3 giorni consecutivi in condizioni sterili. I parametri scelti sono quelli comunemente utilizzati in clinica nelle applicazioni del laser MLS per il trattamento dell'edema. I campioni trattati sono stati confrontati con i controlli mantenuti nelle stesse condizioni, ad eccezione dell'irraggiamento laser.

1.3. Vitalità e proliferazione cellulare

La valutazione degli effetti del trattamento laser sulla vitalità e proliferazione delle cellule (fibroblasti dermici, MCF-7 e MDA-MB361) è stata effettuata mediante l'utilizzo di un conta cellule automatizzato (ADAM-MC, Digital Bio, NanoEnTek Inc, Korea). Questo sistema si basa sulla marcatura del DNA delle cellule con Ioduro di Propidio (PI), un colorante fluorescente. Poiché questo colorante non è in grado di permeare la membrana cellulare, per valutare il contenuto di DNA è necessario permeabilizzare le cellule. Dopo 24h dal primo e dal terzo trattamento le cellule sono state staccate con tripsina/EDTA e risospese in medium di coltura. Ugual volume della sospensione cellulare è stato marcato con la soluzione T (PI/soluzione di lisi) e con la soluzione N (PI/PBS), secondo le istruzioni. La soluzione T permeabilizza la membrana plasmatica, marca i nuclei e consente di misurare il numero totale di cellule, mentre la soluzione N marca esclusivamente le cellule non vitali. Mediante l'utilizzo di una camerina monouso, i campioni vengono caricati nello strumento per la lettura. La fluorescenza del PI è eccitata da una sorgente laser a 532nm, che focalizza automaticamente sulla sospensione cellulare contenuta nella camerina monouso. L'emissione del PI a 605 nm viene raccolta e analizzata grazie ad una camera CCD (dispositivo ad accoppiamento di carica). Le cellule vitali sono state calcolate per differenza tra cellule totali e cellule non vitali. I dati forniti rappresentano la media dei conteggi effettuati su 22 differenti fotogrammi acquisiti in modo random su ciascun campione. Perciò il metodo è altamente affidabile.

1.4. Analisi del ciclo cellulare

La distribuzione della popolazione cellulare (fibroblasti dermici, MCF-7 e MDA-MB361) lungo le fasi del ciclo è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. Anche questo saggio si basa sulla marcatura del DNA delle cellule con lo Ioduro di Propidio (PI). Il citofluorimetro, eccitando il PI legato al DNA, ne rivela la fluorescenza, la cui intensità è proporzionale alla quantità di PI legato, che a sua volta è proporzionale alla quantità di DNA presente nella cellula: cellule in fase G2 e M hanno una quantità doppia di DNA rispetto alle cellule in fase G1, mentre le cellule in fase S hanno una quantità intermedia di DNA perché in fase di replicazione. La valutazione della progressione delle cellule lungo le fasi del ciclo richiede la sincronizzazione delle cellule, che è stata ottenuta con

un metodo non farmacologico, che si basa sull'abbassamento della concentrazione di siero nel medium di coltura. In dettaglio, le cellule sono state lasciate crescere a confluenza in multiwell da 6 pozzetti dopodiché sono state starvate per 48h con DMEM impoverito di siero (FBS 0.5%). Questa condizione induce un arresto delle cellule in fase G1/S. Successivamente, le cellule sono state staccate e piastrate con normale medium di coltura (DMEM con FBS al 10%) al 60% di confluenza in multiwell da 24 pz. Dopo 6h dalla piastratura è stato effettuato il trattamento laser. Passate 24 h dal trattamento, le cellule sono state preparate per l'analisi al citofluorimetro. In particolare, dopo il distacco con tripsina le cellule sono state lavate due volte in PBS e successivamente incubate per 30 min a 4°C con un buffer di lisi (0.1% w/v citrato di sodio, 0.1% NP-40) contenente 10µg/ml di PI. I campioni sono stati poi letti al citofluorimetro (FACS Canto flow cytometer, Bencton & Dickinson, Franklin Lakers, NJ, USA).

1.5.Valutazione dell'apoptosi

La percentuale di cellule (fibroblasti dermici, MCF-7 e MDA-MB361) andate incontro ad apoptosi è stata calcolata mediante analisi citofluorimetrica e utilizzo del kit Guava Nexin (GUAVA Technologies, Hayward, CA). Questo saggio utilizza l'Annessina V-PE (coniugata a ficoeritrina) per marcare le fosfatidilserine sulla membrana esterna delle cellule apoptotiche. Normalmente questi fosfolipidi sono rivolti verso il lato interno della membrana ma durante l'apoptosi traslocano sul lato esterno ed in tal modo vengono legati dall'Annessina V-PE. Il colorante 7-aminoactinomicina D, presente nel kit, viene utilizzato come indicatore della integrità strutturale della membrana, al fine di valutare le cellule reattive all'Annessina nelle fasi precoci e tardive del processo apoptotico. Infatti, il colorante 7-aminoactinomicina D viene escluso dalle cellule sane e da cellule nelle prime fasi di apoptosi mentre penetra nelle cellule in apoptosi tardiva e nelle cellule morte. Alla fine dell'esperimento le cellule, prelevate da ogni piastra, sono state lavate in PBS, centrifugate e risospese in Nexin Buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 CaCl₂, pH 7.40) alla concentrazione di 10⁵ cellule/ml. Successivamente sono stati aggiunti Annessina V-PE e 7-AA-D fino a raggiungere 50 µl finali di volume. Dopo incubazione per 20 min a 4°C i campioni sono stati diluiti con Nexin Buffer e letti al citofluorimetro.

1.6.Saggio di clonogenicità

Il saggio di clonogenicità permette di valutare la capacità di una cellula di proliferare indefinitamente, una caratteristica che clinicamente potrebbe facilitare la recidiva di un tumore [Hao et al., 2012]. L'effetto del laser sulla "cloning efficiency", ovvero la capacità delle cellule di formare colonie, è stato valutato in accordo con il metodo di Sombbrero e collaboratori [Sombbrero et al., 1985]. In dettaglio, le cellule (fibroblasti dermici, MCF-7 e MDA-MB361) sono state piastrate in DMEM con FBS al 10% all'interno di pozzetti di un multiwell da 24 (vedere paragrafo 1.2 di questo capitolo). Le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 1×10^2 cellule/pz in modo da favorire l'adesione di singole cellule e la crescita di una colonia derivante da singola cellula. Dopo 24h di incubazione, quando le cellule risultano adese al fondo del pozzetto ma ancora non si sono replicate, è stato effettuato il trattamento laser come descritto precedentemente. I campioni trattati ed i controlli sono stati osservati fino a 21 giorni, in base al ritmo proliferativo della singola linea cellulare. Le colonie sono state fissate in metanolo e acido acetico (3:1 vol/vol), colorate con una soluzione di acido acetico (50%) e orceina (1%) e contate con un contatore di colonie automatizzato (OxfordOptronix). La "cloning efficiency" è stata determinata come percentuale di colonie rispetto al numero di cellule seminate per ciascuna linea cellulare. Per valutare l'effetto del trattamento laser sulla "cloning efficiency" delle varie popolazioni cellulari, i dati sono stati espressi come percentuale di colonie nelle colture trattate rispetto alle colture di controllo.

1.7.Analisi statistica

I dati sono riportati come media \pm deviazione standard e si riferiscono a tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando lo Student's t-test per dati non accoppiati ed i risultati con $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

2. MATERIALI E METODI RELATIVI ALLO STUDIO SULL'APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL MUCOSITI ORALI

2.1. Colture cellulari

Cellule HEK (human embryonic kidney cells) esprimenti il recettore di tipo Toll 2 (Toll-like receptor 2) o di tipo Toll 4 (Toll-like receptor 4) umano (HEK-293-hTLR4/CD14/MD2 e HEK-293-hTLR2) sono state gentilmente donate dal Prof. Mancuso dell'Università di Messina. Le cellule sono state coltivate in terreno DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) addizionato di antibiotici (penicillina 0.59 g/l; streptomicina 1g/l), glutammina (2mM) e siero fetale bovino al 10%. Le cellule sono state mantenute a 37 °C in incubatore con atmosfera costituita per il 5% da CO₂, per mantenere il pH tra 7.3-7.5.

Per l'esperimento, queste cellule sono state trasfettate, mediante elettroporazione (ElectroSquare Porator, 355V per 10msec), con il plasmide pNiFty2-luc NF-kB in cui il gene reporter (luciferasi) è sotto il controllo di NF-kB. Le cellule trasfettate sono state selezionate in presenza di 100 µg/ml di zeocina (Invitrogen) per 48 ore e testate per attività luciferasica. I cloni positivi sono stati mantenuti nelle stesse condizioni di coltura descritte sopra, eccetto l'aggiunta di zeocina (100 µg/ml) nel medium.

Le cellule dendritiche derivate da monociti (mono-DC) sono state ottenute dalla frazione di cellule mononucleate del sangue periferico di donatori sani (forniti dal Centro Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera Careggi, Firenze).

2.2. Colture fungine

Le cellule di *C. albicans* (SC-53-14, ATCC MYA-2876), *C. parapsilosis* (YA4), *C. glabrata* (YUC23), e *S. cerevisiae* (S288c) sono state coltivate in piastre di agar (YPD-A, peptone 20 g/l, estratto di lievito 10 g/l, glucosio 20 g/l, agar 15 g/l) a 28 °C per circa due giorni. Singole colonie di ogni coltura fungina sono state raccolte e coltivate in terreno

liquido (YPD-A, peptone 20 g/l, estratto di lievito 10 g/l, glucosio 20 g/l) a 28 °C per circa 18 ore prima dell'inizio del trattamento.

2.3.Trattamento laser

I trattamenti sono stati effettuati utilizzando un sistema laser MLS (Multiwave Laser System, ASA srl). L'apparecchio e le modalità con cui è viene eseguito l'irraggiamento sono stati descritti precedentemente (paragrafo 1.2 di questo capitolo).

Per l'esposizione, trascorse le 18h di coltura (vedere sopra, paragrafo 2.2 di questo capitolo), le cellule (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *S.cerevisae*) sono state raccolte, lavate due volte in una soluzione di penicillina/streptomina 1x e acqua bidistillata e piastrate in triplicato alla concentrazione di 10^7 cellule/pozzetto. Sono stati testati quattro protocolli di trattamento, diversi per tempo di esposizione e energia totale rilasciata (Tab. I). La modalità di esposizione prevedeva due irraggiamenti laser, intervallati da 1h, effettuati in condizioni sterili. I campioni trattati sono stati confrontati con i controlli mantenuti nelle stesse condizioni, ad eccezione dell'irraggiamento laser.

| | Frequenza | Tempo/esposizione | Dose (J/cm ²)/esposizione | Energia totale rilasciata (J) |
|-----------|-----------|-------------------|--|----------------------------------|
| P1 | 1500 Hz | 1'15" | 2 | 50 |
| P2 | 1500 Hz | 2'29" | 3,5 | 100 |
| P3 | 1500 Hz | 4'58" | 7 | 200 |
| P4 | 1500 Hz | 12'24" | 18 | 500 |

Tab. I Parametri relativi ai protocolli di trattamento

2.4.Proliferazione delle cellule fungine

Le cellule fungine sono state piastrate alla concentrazione di 10^7 cellule/ml in piastre da 24 pozzetti e irradiate secondo il protocollo di trattamento adottato. Attraverso diluizioni seriali, le cellule sono state piastrate in terreno solido YPD-A (1% estratto di lievito, 2% peptone, 2% glucosio, agar 15 g/l) subito dopo il trattamento laser. Dopo 3 giorni di

crescita a 28°C è stata valutata la capacità delle cellule fungine di generare unità formanti colonia (UFC). La percentuale di cellule in grado di formare colonie è stata calcolata in relazione alla stessa capacità di cellule non esposte al trattamento laser.

2.5. Valutazione dell'apoptosi delle cellule fungine

La percentuale di cellule (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, e *S. cerevisiae*) andate incontro ad apoptosi è stata calcolata mediante analisi citofluorimetrica (ACCURI, B&D San Jose, CA) e utilizzo del kit Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostics, Germany). Per l'analisi, le cellule sono state coltivate in medium liquido (YPD, peptone 20 g/l, estratto di lievito 10 g/l, glucosio 20 g/l) a 28 °C per circa 24 ore prima dell'inizio del trattamento. Successivamente, 100 µl di ciascuna delle colture fungine sono stati risospesi in 4 ml di medium di coltura. Ogni sospensione è stata lavata due volte con una soluzione di penicillina/streptomicina 1x e acqua bidistillata e sono state preparate tre aliquote con 2×10^6 cellule ciascuna. Due aliquote sono state, rispettivamente, trattate o non trattate con il laser mentre la terza è stata trattata con acido acetico 175 mM (10 min a temperatura ambiente) e utilizzata come controllo positivo di apoptosi. Subito dopo il trattamento, le cellule sono state lavate e incubate con 100µl di Zimoliasi (2µg / ml in H₂O-P/S) a 37 °C per 30 min. Dopo un ulteriore lavaggio le cellule sono state trattate con la soluzione marcante (Annexina-V-FITC e PI) secondo il protocollo suggerito dal produttore. I dati sono stati analizzati mediante software CFlowPlus. Per ogni campione, sono stati acquisiti diecimila eventi.

2.6. Isolamento di cellule dendritiche

Le cellule dendritiche sono state generate dalla frazione di cellule mononucleate (PBMC) ottenuta dai campioni di sangue venoso periferico dei donatori. In dettaglio, il sangue intero è stato diluito in rapporto 1:3 con PBS/EDTA pH 7.2 ed in seguito stratificato su gradiente di Ficoll/Paque (GE Healthcare Italia, Milano, Italia). L'anello di mononucleati (PBMC) è stato recuperato e lavato e, grazie ad una selezione immunomagnetica positiva operata con l'ausilio di anticorpi monoclonali anti-CD14 legati a microbiglie (Miltenyi Biotech Bergisch Gladbach, Germania), è stata recuperata una popolazione arricchita di cellule CD14+. Le cellule dendritiche sono state generate ex-vivo coltivando le cellule

precedentemente recuperate in RPMI 1640 con 800 U/ml rGM-CSF (HR granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) e 20 ng/ml IL-4 (human recombinant (HR) interleukin 4) (R&D System, Minneapolis, MN) per 5 giorni a 37 °C e 5% di CO₂. Per l'esperienza, dopo i 5 giorni con terreno di differenziazione, le cellule dendritiche sono state stimolate, in rapporto 1:10, con le cellule fungine (vedere paragrafo 2.2 di questo capitolo) trattate o non trattate con il laser. Dopo 16h di stimolazione i campioni sono stati processati per effettuare il saggio delle citochine IL-1 β e IL-6.

2.7.Saggio delle citochine

La concentrazione delle citochine presenti nei campioni di cellule dendritiche, stimolate con le colture fungine non trattate o trattate con laser, e' stata determinata con il Bio-Plex Protein Array System (Bio-Rad, US). E' stato utilizzato il kit commerciale Milliplex kit (Millipore, US), che ha consentito la quantificazione simultanea delle seguenti citochine: IL-1 β , IL-6. Il kit e' stato utilizzato in accordo con il protocollo suggerito dal produttore. Le concentrazioni delle citochine sono state automaticamente calcolate dal programma Bio-Plex Manager software 4.1(Bio-Rad, U).

2.8.Saggio dei Toll-like receptors

L'attivazione dei recettori di tipo Toll 2 e 4 (Toll-like receptors, TLRs) è stata studiata mediante saggio di attività luciferasica. Le luciferasi sono una famiglia di enzimi prodotti naturalmente da un certo numero di specie, in particolare quelle del genere Lampyridae (luciola). Questi enzimi catalizzano l'ossidazione di piccoli substrati eterociclici chiamati luciferine, generando processi di bioluminescenza. Questa proprietà della luciferasi viene sfruttata mettendo il gene che la codifica (gene reporter) sotto il controllo di un fattore di trascrizione per un gene di interesse. L'attivazione trascrizionale del gene di interesse può essere monitorata da luminescenza. Per effettuare il saggio, cellule HEK-293-hTLR2 e HEK-293-hTLR4, sono state transfettate con il plasmide pNiFty2-luc NF-kB, in cui il gene reporter (luciferasi) è sotto il controllo di NF-kB. Le cellule sono state piastrate in DMEM con FBS al 10% in pozzetti di un multiwell da 96 alla concentrazione di 2×10^5 cellule/pozzetto e mantenute per 8 ore in presenza o in assenza delle cellule

fungine non trattate o trattate con il laser. Lo zimosano (100 µg/ml) e il lipopolisaccaride (LPS) (1µg/ml) sono stati utilizzati come controlli positivi, rispettivamente per l'attività del recettore di tipo Toll 2 e di tipo Toll 4. A fine incubazione, l'analisi dell'attività luciferasica è stata valutata mediante l'utilizzo del kit "Steady-Glo[®]Luciferase Assay System" (Promega) in accordo con le specifiche del produttore. La lettura è stata eseguita mediante spettrofotometro (VICTOR microplate luminescence reader, Perkin Elmer).

2.9. Analisi statistica

I dati sono riportati come media ± deviazione standard e si riferiscono a tre esperimenti indipendenti effettuati in triplicato. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando lo Student's t-test per dati non accoppiati ed i risultati con $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

3. MATERIALI E METODI RELATIVI ALLO STUDIO SULLE APPLICAZIONI DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLA GENGIVOSTOMATITE FELINA

3.1. Reclutamento dei soggetti e disegno dello studio clinico veterinario

Nello studio sono stati inclusi 10 gatti affetti da FCGS (feline chronic gingivo-stomatitis). Dopo l'acquisizione del consenso informato dei proprietari, i dati di ogni soggetto arruolato sono stati raccolti in una scheda clinica indicante: segnalamento, anamnesi clinica e anamnesi terapeutica (terapie mediche e chirurgiche eseguite). Ogni soggetto è stato sottoposto ad una visita clinica in sedazione/anestesia per accertare clinicamente la presenza di FCGS e ad uno studio radiografico completo del cavo orale per accertare la presenza di radici ritenute, malattia parodontale, FORL o altre patologie radiologicamente evidenziabili. Durante la visita è stato effettuato un prelievo bioptico nell'area della lesioni ed i campioni così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi istologica e ad analisi mediante microscopia di fluorescenza. Durante ogni seduta di laserterapia, eseguita in stato di veglia, sono stati effettuati controlli clinici intermedi ed è stato interrogato il

proprietario del gatto sulla sintomatologia quotidiana, con particolare riferimento all'assunzione del cibo, allo sbadiglio e alla cura del mantello. Alla fine della terapia è stata eseguita una visita clinica di controllo in sedazione/anestesia ed è stato effettuato un secondo prelievo bioptico. Anche in questo caso, i campioni ottenuti dalla biopsia sono stati sottoposti ad analisi istologica e ad analisi mediante microscopia di fluorescenza.

Sono stati esclusi dallo studio i gatti che avevano subito terapie a base di cortisonici, antibiotici, FANS o combinazione di questi farmaci in un periodo inferiore ai 20 giorni e i soggetti con patologie sistemiche.

3.2. Trattamento laser

I trattamenti sono stati effettuati utilizzando un sistema laser MLS (Multiwave Laser System, ASA srl). Questo strumento, descritto in dettaglio precedentemente (paragrafo 1.2 di questo capitolo), viene da qualche anno applicato anche in campo veterinario, dove ha dimostrato una notevole efficacia nel trattamento di numerose patologie.

In questo studio, i soggetti sono stati divisi in due gruppi (5 soggetti nel primo gruppo e 5 nel secondo) e trattati con due protocolli diversificati in base alla dose energetica. I due protocolli prevedevano, in entrambi i casi, 30 Hz di frequenza, ma nel primo protocollo è stata somministrata una densità di energia di 0.32 J/cm^2 , mentre nel secondo 0.16 J/cm^2 . Entrambi i gruppi hanno ricevuto 2 trattamenti settimanali per 5 settimane consecutive (10 trattamenti totali). In questo studio, la modalità di somministrazione del trattamento prevedeva, con entrambe le dosi studiate, l'irraggiamento di 6 punti localizzati nell'area soggetta all'infezione.

3.3. Istologia

Piccoli frammenti di mucosa orale sono stati rimossi chirurgicamente dalle zone clinicamente soggette all' infezione prima e dopo la terapia laser. I frammenti sono stati fissati in formaldeide al 4% in tampone di fosfato 0,1 M a pH 7,4, disidratati secondo una scala crescente di etanolo ed inclusi in paraffina per l'analisi al microscopio ottico. Dai campioni così ottenuti sono state tagliate al microtomo sezioni di $6 \mu\text{m}$ di spessore. Le

sezioni sono state poi colorate con ematossilina e eosina ed esaminate al microscopio ottico Reichert Microstar IV. Questo microscopio è dotato di una videocamera Eureka 9 ad alta risoluzione (BEL Engineering, Monza, Italia) ed è interfacciato con un PC mediante un software dedicato (Belview , BEL Engineering). Ogni campione è stato sottoposto a una valutazione semi-quantitativa dei cambiamenti istopatologici che coinvolgono l'epitelio di superficie, l'infiltrato infiammatorio ed i vasi sanguigni nella lamina propria. I criteri di valutazione utilizzati sono riportati nella tabella 1. La misura è stata eseguita su almeno 3 campi microscopici esaminati con un ingrandimento finale 400x.

| Condizione generale | Epitelio di superficie | Infiltrato infiammatorio | Capillari sanguigni |
|---------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|
| + normale | integro | focale | normali |
| ++ media | assottigliato | A banda | dilatati |
| +++ grave | ulcerato | Esteso in profondità | -- |

Tab. II – Criteri di valutazione per l'analisi istopatologica

3.4. Microscopia di immunofluorescenza

Per l'analisi di immunofluorescenza, le sezioni istologiche sono state sottoposte alle fasi di sparaffinatura e reidratazione, che prevedono passaggi in xilolo e in scala discendente di etanolo. I campioni sono stati poi lavati con PBS senza Ca^{2+} e Mg^{2+} ed i siti di legame aspecifici sono stati bloccati utilizzando una soluzione di PBS contenente il 3% di BSA. Dopo incubazione overnight a 4°C con anticorpo diretto contro l'antigene di superficie CD3 coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC), le sezioni sono state analizzate con un microscopio ad epifluorescenza (Nikon) e le immagini raccolte con una telecamera CCD (DTA). I campioni sono stati esaminati con un ingrandimento finale 100x. Per ogni vetrino sono stati analizzati almeno 30 campi-immagine scelti in maniera random e l'intensità di fluorescenza espressa come media \pm deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando lo Student's t-test per dati non accoppiati ed i risultati con $p < 0.05$ sono stati considerati significativi.

RISULTATI

1. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL LINFEDEMA POST-MASTECTOMIA. Valutazione della sicurezza della radiazione laser su colture di cellule tumorali

In letteratura ci sono numerose evidenze in favore dell'applicazione della laserterapia nel trattamento del linfedema post-mastectomia. I noti effetti terapeutici del laser, discussi nella sezione introduttiva, lo rendono un trattamento assai efficace nel ridurre la sintomatologia di questa patologia. Tuttavia, le conoscenze riguardo agli effetti della radiazione laser sulle cellule tumorali e sulla progressione della malattia tumorale sono ancora insufficienti. La possibilità che il trattamento laser interferisca con la progressione della malattia oncologica è un'ipotesi che dà adito a criticità.

Questo studio aveva lo scopo di valutare gli effetti dell'esposizione alla radiazione laser (MLS) su colture di cellule tumorali. Come modelli sperimentali, sono state utilizzate, due linee cellulari derivanti da adenocarcinoma della mammella, la linea MCF-7 e la linea MDA-MB361, ed una coltura primaria di fibroblasti dermici umani, usati come controllo non tumorale. In particolare, si è studiato l'effetto del trattamento MLS su vitalità e proliferazione cellulare, apoptosi, distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare e cloning efficiency, ovvero la capacità delle cellule di formare colonie. I campioni trattati sono stati confrontati con controlli mantenuti in identiche condizioni, tranne per l'esposizione al laser.

1.1. Valutazione della vitalità e proliferazione di cellule tumorali esposte al trattamento MLS

Per verificare se l'esposizione al laser MLS comportava alterazioni della vitalità cellulare e dei ritmi proliferativi è stato utilizzato un conta cellule automatizzato (ADAM-MC, Digital Bio, NanoEnTek Inc, Korea). Le valutazioni sono state effettuate, sia dopo un unico trattamento che dopo tre trattamenti eseguiti in giorni consecutivi. Nella Fig. 1 è riportata la percentuale di cellule vitali valutata dopo 24 ore dal primo (a) e dal terzo trattamento (b), rispettivamente.

In tutti i modelli cellulari considerati, non si sono osservate differenze significative fra controlli e trattati, sia dopo il primo che dopo il terzo trattamento.

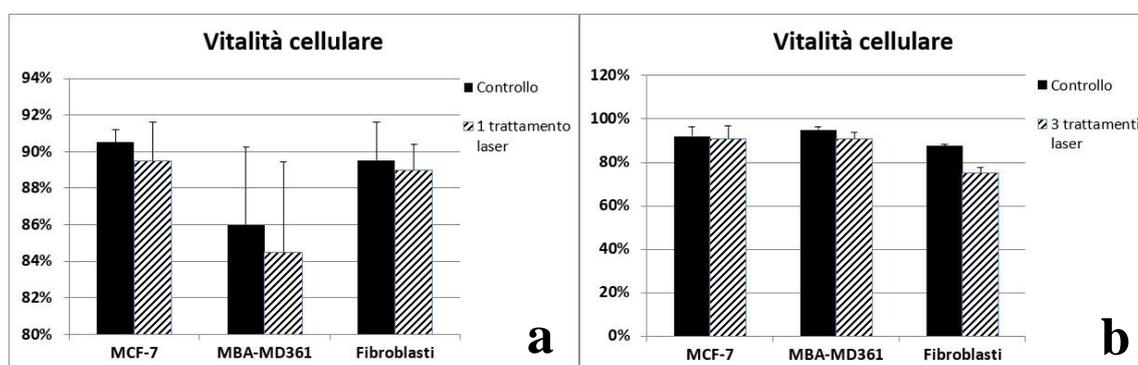


Fig.1 Vitalità cellulare dei modelli sperimentali considerati (MCF-7, MDA-MB361 e fibroblasti) valutata 24 h dopo un singolo trattamento laser (a) e 24h dopo tre trattamenti laser (b). I dati sono stati ottenuti mediante analisi con un conta cellule automatizzato ADAM-MC (Digital Bio, NanoEnTek Inc, Korea)

Nella Fig. 2 sono riportati i dati sulla proliferazione cellulare, valutata sempre dopo 24 h dal primo (a) e dopo 24 h dal terzo trattamento (b). Dopo il primo trattamento, nelle MCF-7 si osserva un leggero decremento del numero di cellule nel campione trattato rispetto al controllo ($p=0,29$). Contrariamente, nei fibroblasti, si osserva un leggero incremento ($p=0,30$). Nella valutazione effettuata 24 h dopo il terzo trattamento si osserva, sia nelle MCF-7 ($p=0,20$) che nelle MDA-MB361 ($p=0,25$), un leggero decremento nel numero di cellule del campione trattato rispetto al controllo. Dato che le differenze osservate non sono significative, possiamo concludere che il trattamento laser non ha effetti rilevanti sui ritmi proliferativi dei modelli cellulari considerati.

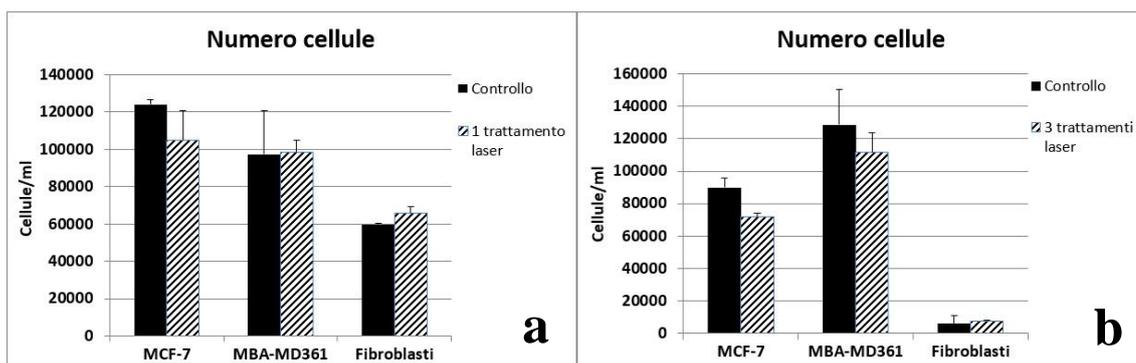


Fig.2 Proliferazione cellulare dei modelli sperimentali considerati (MCF-7, MDA-MB361 e fibroblasti) valutata 24 h dopo un singolo trattamento laser (a) e 24h dopo tre trattamenti laser (b). I dati sono stati ottenuti mediante analisi con un conta cellule automatizzato ADAM-MC (Digital Bio, NanoEnTek Inc, Korea)

1.2.Valutazione dell'apoptosi di cellule tumorali esposte al trattamento MLS

Per valutare la possibilità che il trattamento laser modifichi la soglia apoptotica, è stato effettuato un saggio con Annessina V-PE. Questa proteina, che è coniugata ad un fluoroforo, marca le fosfatidilserine esposte sulla membrana esterna delle cellule apoptotiche. Dai risultati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica (Fig.3), si è osservato che sia un singolo trattamento sia tre trattamenti consecutivi non comportano, rispetto al controllo, modificazioni nella percentuale di cellule vive, cellule in apoptosi precoce e cellule in apoptosi tardiva. Questo risultato è stato osservato in tutti i modelli cellulari considerati.

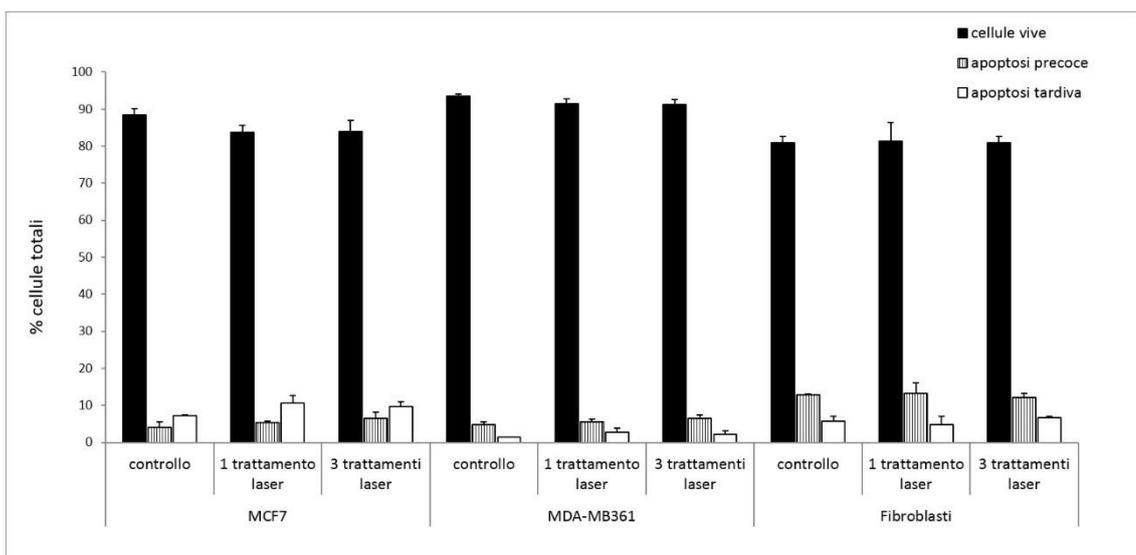


Fig.3 Percentuale di cellule vive, in apoptosi precoce e in apoptosi tardiva nei modelli sperimentali considerati (MCF-7, MDA-MB361 e fibroblasti). L'analisi è stata valutata 24 h dopo un singolo trattamento laser e 24h dopo tre trattamenti laser.

1.3.Valutazione della progressione del ciclo cellulare di cellule tumorali esposte al trattamento MLS

Per valutare se il trattamento MLS comportava alterazioni della distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stato effettuato un saggio citofluorimetrico che si basa sulla marcatura del DNA delle cellule con Ioduro di Propidio (PI). L'analisi ha richiesto la sincronizzazione delle cellule, condizione che è stata ottenuta mediante riduzione della concentrazione di siero nel medium di coltura. La percentuale di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata determinata 24h dopo un singolo trattamento. I dati ottenuti (Tab. II) non evidenziano differenze significative tra i campioni trattati ed i relativi controlli in tutti i modelli cellulari considerati. Pertanto, la radiazione laser non influisce sulla progressione del ciclo cellulare.

| | | G1 (%) | S (%) | G2/M (%) |
|--------------------|---------------------------|----------|----------|----------|
| MCF-7 | Cellule non sincronizzate | 66,4±0,2 | 24,3±0,3 | 9,3±0,2 |
| | Cellule sincronizzate | 89,3±0,8 | 7,6±0,5 | 3,1±0,3 |
| | Controllo | 46,9±0,3 | 46,3±0,5 | 6,8±0,2 |
| | Laser | 48,3±1,4 | 45,5±0,9 | 6,2±0,4 |
| MDA-MB-361 | Cellule non sincronizzate | 69,4±0,6 | 28,9±0,9 | 1,7±0,3 |
| | Cellule sincronizzate | 74,9±0,2 | 22,7±0,4 | 2,4±0,6 |
| | Controllo | 62,7±0,3 | 29,3±0,2 | 8,0±0,2 |
| | Laser | 62,9±0,2 | 28,8±0,2 | 8,3±0,2 |
| Fibroblasti | Cellule non sincronizzate | 65,7±2,2 | 29,5±3,4 | 4,8±1,2 |
| | Cellule sincronizzate | 82,1±0,7 | 5,0±1,4 | 12,9±0,7 |
| | Controllo | 67,9±1,7 | 18,2±2,9 | 13,9±1,1 |
| | Laser | 68,1±1,6 | 17,2±1,7 | 14,7±1,3 |

Tab.II Analisi del ciclo cellulare nei modelli sperimentali considerati (MCF-7, MDA-MB361 e fibroblasti) dopo 1 trattamento laser. Come controllo positivo del metodo di sincronizzazione sono stati valutati campioni mantenuti in normali condizioni di coltura (10%) o in bassa concentrazione di siero (0.5% FBS).

1.4. Valutazione della “cloning efficiency” di cellule tumorali esposte al trattamento MLS

L'effetto del trattamento laser sulla “cloning efficiency”, ovvero la capacità delle cellule di formare colonie, è stato valutato in accordo con il metodo di Sombrero e collaboratori [Sombrero et al., 1985].

Dai risultati ottenuti abbiamo osservato che, nei fibroblasti e nelle cellule MDA-MB36, i campioni di controllo non risultano capaci di formare colonie. Al contrario, le MCF-7 hanno capacità, sebbene non molto spiccata, di formare colonie. In seguito al trattamento, nei fibroblasti e nelle cellule MDA-MB36, non viene osservata formazione di colonie mentre, nelle MCF-7, la percentuale di colonie rimane inalterata e non differisce dai campioni di controllo non trattati (Tab. III). Questo risultato, di cui è importante sottolineare la rilevanza mostra che il laser, non solo non induce alterazioni nella percentuale delle colonie formate dalle MCF-7, ma non ha effetti sulla clonogenicità dei fibroblasti e sulle cellule MDA-MB36. Queste due modelli, non capaci di formare colonie, non acquisiscono questa abilità dopo il trattamento.

| Modello cellulare | Numero di colonie (% rispetto al controllo) | |
|-------------------|---|-------|
| | Controllo | Laser |
| Fibroblasti | 0 | 0 |
| MCF-7 | 19 | 18 |
| MDA-MB-361 | 0 | 0 |

Tab.III Numero di colonie valutate nei modelli sperimentali considerati (MCF-7, MDA-MB361 e fibroblasti) dopo 3 trattamenti laser.

2. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Valutazione degli effetti del laser sulla sopravvivenza e sul potenziale infiammatorio di specie patogene coinvolte nella patogenesi delle mucositi orali

In seguito ai trattamenti oncologici, la mucosa orale è soggetta ad alterazioni che non le permettono di mantenere la sua funzione di protezione. Questo si traduce in una maggiore predisposizione ad infezioni batteriche, fungine o virali. Il processo infiammatorio indotto dai microrganismi patogeni comporta notevoli peggioramenti della sintomatologia clinica e ostacola fortemente il normale processo di guarigione. Tra i microrganismi patogeni coinvolti nelle infezioni orofaringee *Candida albicans* è l'agente eziologico più frequente. Recenti dati, riportati in letteratura, dimostrano che radiazioni laser nel vicino infrarosso hanno proprietà fotoinattivanti nei confronti di batteri e funghi patogeni [Bornstein et al., 2009]. Alla luce di questi dati e dell'efficacia dimostrata della laserterapia nelle infezioni orofaringee [Lino et al., 2011; Bjordal et al., 2011], lo scopo di questa parte del progetto di dottorato è stato studiare l'effetto del sistema laser MLS su cellule di *Candida sp.* più frequentemente coinvolte nella patogenesi della candidosi orofaringea. In particolare, lo studio si è concentrato sulle possibili modificazioni delle proprietà proliferative delle cellule fungine e sulle possibili modificazioni delle proprietà immunogene, che ovviamente influiscono sull'efficacia della risposta immunitaria dell'ospite nei confronti dell'agente patogeno.

2.1. Valutazione della capacità di *C. albicans* di formare colonie in conseguenza al trattamento MLS

Per verificare se l'esposizione ad MLS comportava alterazioni delle capacità proliferative delle cellule fungine è stata effettuata una valutazione quantitativa, sulla base delle unità formanti colonia (CFU), prima e in seguito ai quattro protocolli di trattamento laser sperimentati (Tab. I). La conta delle CFU è stata effettuata 3 giorni dopo l'esposizione. Cellule di *C. albicans* e di *S. cerevisiae* sono state utilizzate come modello di specie fungina patogena e non patogena, rispettivamente. Dalla Fig. 4 si evince che tutti i protocolli di trattamento testati inducono un decremento nel numero delle CFU di *C.*

albicans. Al contrario, *S. cerevisiae* risulta insensibile al trattamento. Per quanto riguarda *C. albicans*, l'effetto maggiore, in termini di abbattimento delle CFU, è stato ottenuto con il protocollo di trattamento P3 (energia totale somministrata 200J; densità di energia 7 J/cm²).

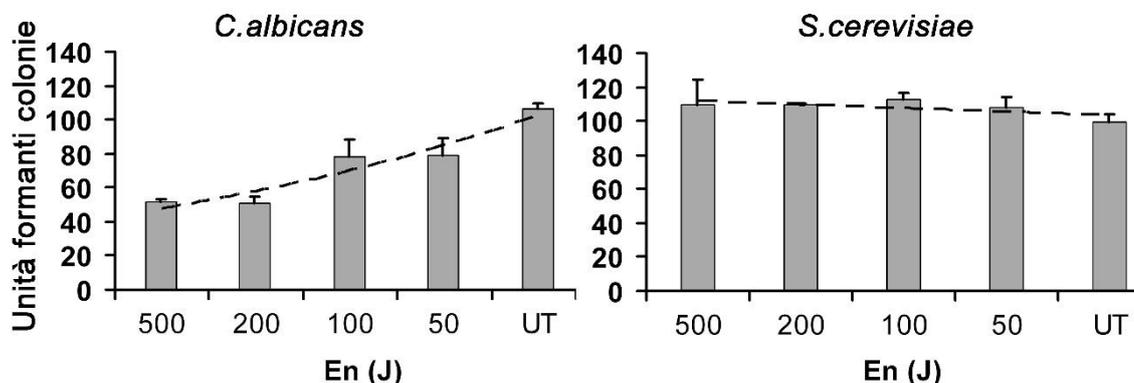


Fig.4 Valutazione delle unità formanti colonia (CFU) di colture di *C. albicans* e *S. cerevisiae* non trattate o trattate secondo i 4 protocolli di trattamento stabiliti (vedere Tab. I). I dati si riferiscono alla media delle CFU determinate 3 giorni dopo la piastratura in terreno solido, effettuata immediatamente dopo il trattamento laser.

2.2. Valutazione della capacità di *Candida sp.* di formare colonie in conseguenza al trattamento MLS

Candida albicans è l'agente eziologico più frequente tra i microrganismi patogeni coinvolti nelle infezioni orofaringee, ma recentemente sono emersi anche altri ceppi patogeni, come le specie *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Alla luce dei primi risultati ottenuti, abbiamo pensato di verificare se il protocollo di trattamento P3, che aveva dato i migliori risultati su *C. albicans*, potesse avere lo stesso effetto, in termini di abbattimento delle CFU, anche in altre specie di *Candida*. Per verificare questa ipotesi abbiamo ripetuto la valutazione delle CFU in campioni di *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* non trattati o trattati con il protocollo P3. Dai risultati ottenuti (Fig.5) abbiamo osservato che il trattamento comporta una riduzione significativa (40%) del numero di CFU in *C. albicans* e in *C. glabrata*. Anche se in misura minore (27%), questo effetto è stato osservato anche in *C. parapsilosis*. *S. cerevisiae* risulta, come nel caso precedente, totalmente insensibile al trattamento. Il trattamento laser P3, che di nuovo si è dimostrato efficace, è stato pertanto utilizzato per i successivi esperimenti.

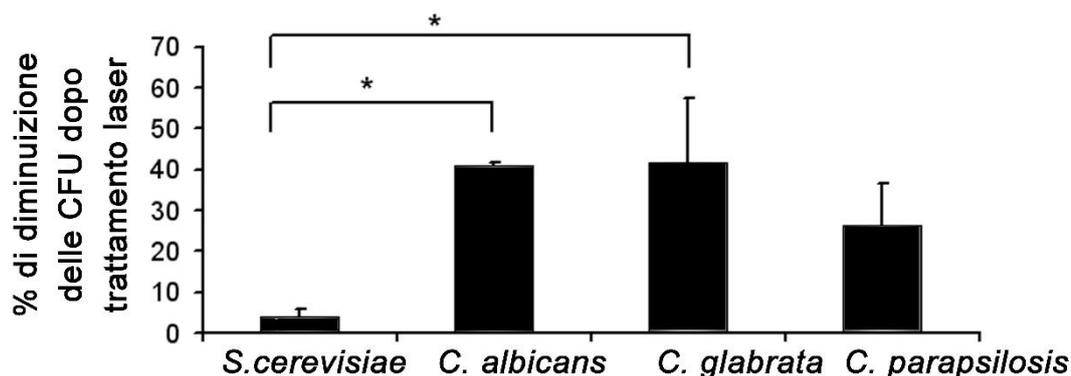


Fig.5 Valutazione delle unità formanti colonia (CFU) di colture di *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* non trattate o trattate con il protocollo laser P3 (vedere Tab. I). I dati si riferiscono alla media delle CFU determinate 3 giorni dopo la piastratura in terreno solido effettuata immediatamente dopo il trattamento laser.

2.3. Valutazione dell' apoptosi di *Candida sp.* in conseguenza al trattamento MLS

Stabilita l'efficacia del laser nel ridurre il numero di CFU nelle specie di *Candida* considerate, il passo successivo è stato investigare sui meccanismi che stanno alla base di questo effetto. L'ipotesi che le cellule vadano incontro ad un processo apoptotico è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica e marcatura con Annexina V. I dati ottenuti (Fig.6) evidenziano che la radiazione laser induce un marcato incremento dell'apoptosi in *C. albicans* e *C. glabrata* mentre lascia inalterata la sopravvivenza di *C. parapsilosis*. Inoltre, è stato osservato che il trattamento laser non induce apoptosi in *S. cerevisiae*.

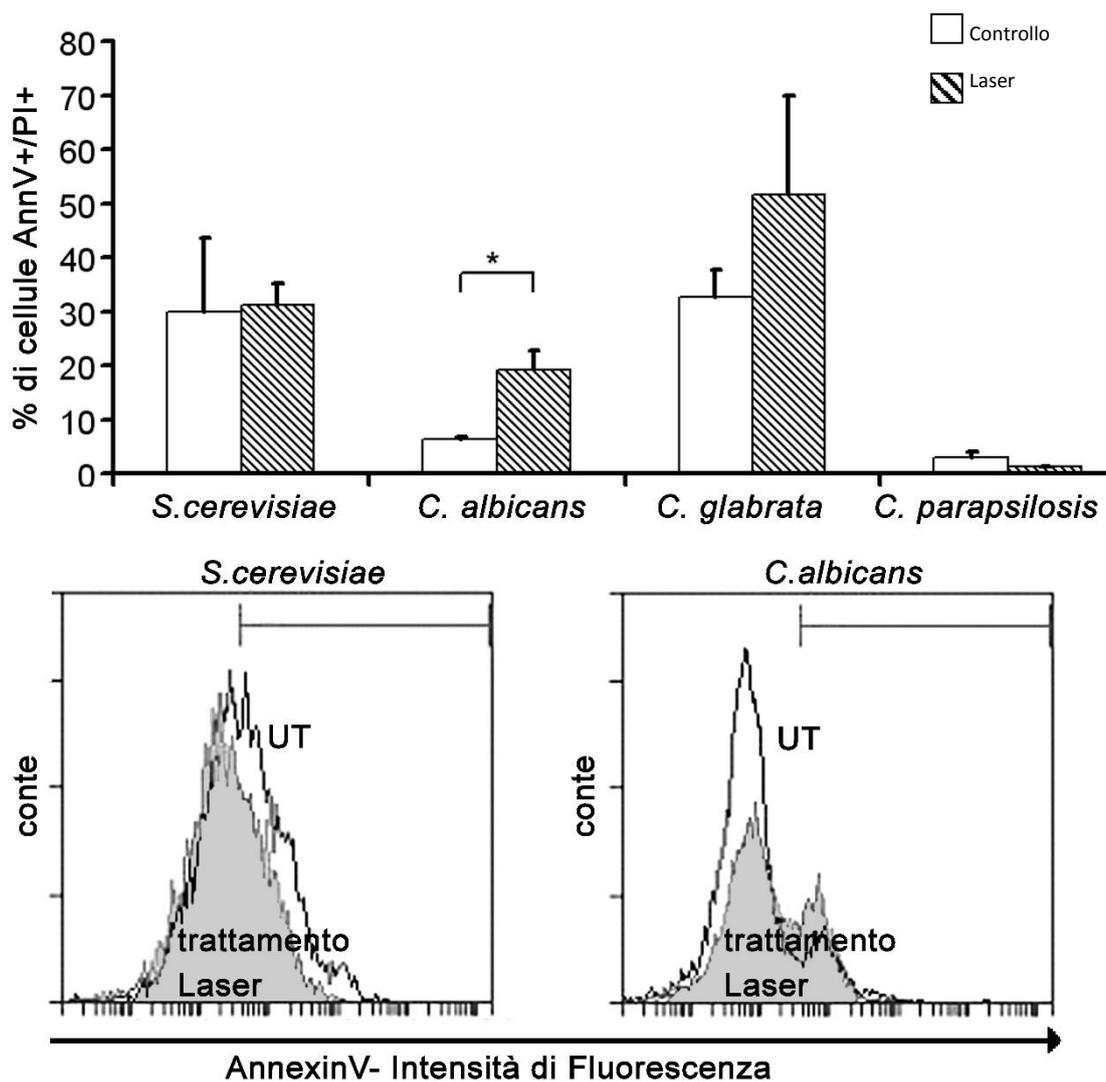


Fig.6 Percentuale di cellule apoptotiche in colture di *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* non trattate o trattate con il protocollo laser P3 (vedere Tab. I). Le analisi sono state effettuate immediatamente dopo il trattamento.

2.4. Valutazione del potenziale infiammatorio delle cellule fungine in conseguenza al trattamento MLS

Le infezioni da *Candida sp.* inducono, da parte delle cellule dell'immunità innata, la produzione di citochine infiammatorie e di citochine in grado di orientare una risposta immune specifica e specializzata nell'eliminazione dei microrganismi. I risultati sulla mortalità ottenuti nei primi esperimenti, hanno fatto avanzare l'ipotesi che la radiazione laser agisca a livello della parete fungina, comportando una destabilizzazione della sua struttura. Considerata l'importanza della composizione della parete fungina nell'induzione di una corretta risposta immunitaria, siamo andati a valutare l'effetto del laser sulle proprietà immunogene delle specie di *Candida*. considerate nello studio. Per tale analisi, colture di cellule dendritiche sono state incubate con cellule di *S. Cerevisiae* e di *Candida sp.*, non trattate o trattate con il laser. L'incubazione con cellule uccise con il calore (95°C per 15 min) e la stimolazione con LPS (50 ng/ml) sono stati considerati come controlli positivi. Dopo 24 h, il medium di coltura è stato raccolto ed è stata analizzata la concentrazione delle citochine IL-1 β e IL-6. Dalla Fig.7A osserviamo che sia *S. cerevisiae* che i vari ceppi di *Candida* sono capaci di indurre la produzione delle due citochine. Tuttavia, confrontando le specie fungine considerate, la quantità di citochine prodotta da parte dei campioni non trattati varia significativamente. *C. albicans* e *S.cerevisiae* inducono, rispettivamente, la minore e la maggiore produzione di entrambe le citochine. Come era atteso, i campioni uccisi con il calore (controllo positivo) inducono una diversa produzione di citochine rispetto a quella indotta da parte di cellule vive. Questo effetto è probabilmente dovuto alla diversa esposizione dei componenti della parete in conseguenza al trattamento con il calore. La Fig.7B evidenzia come il trattamento laser riduca significativamente, in tutti i ceppi di *Candida*, la capacità di indurre la produzione delle due citochine da parte delle cellule dendritiche. Al contrario, in *S. cerevisiae*, l'esposizione alla radiazione laser lascia inalterata questa capacità.

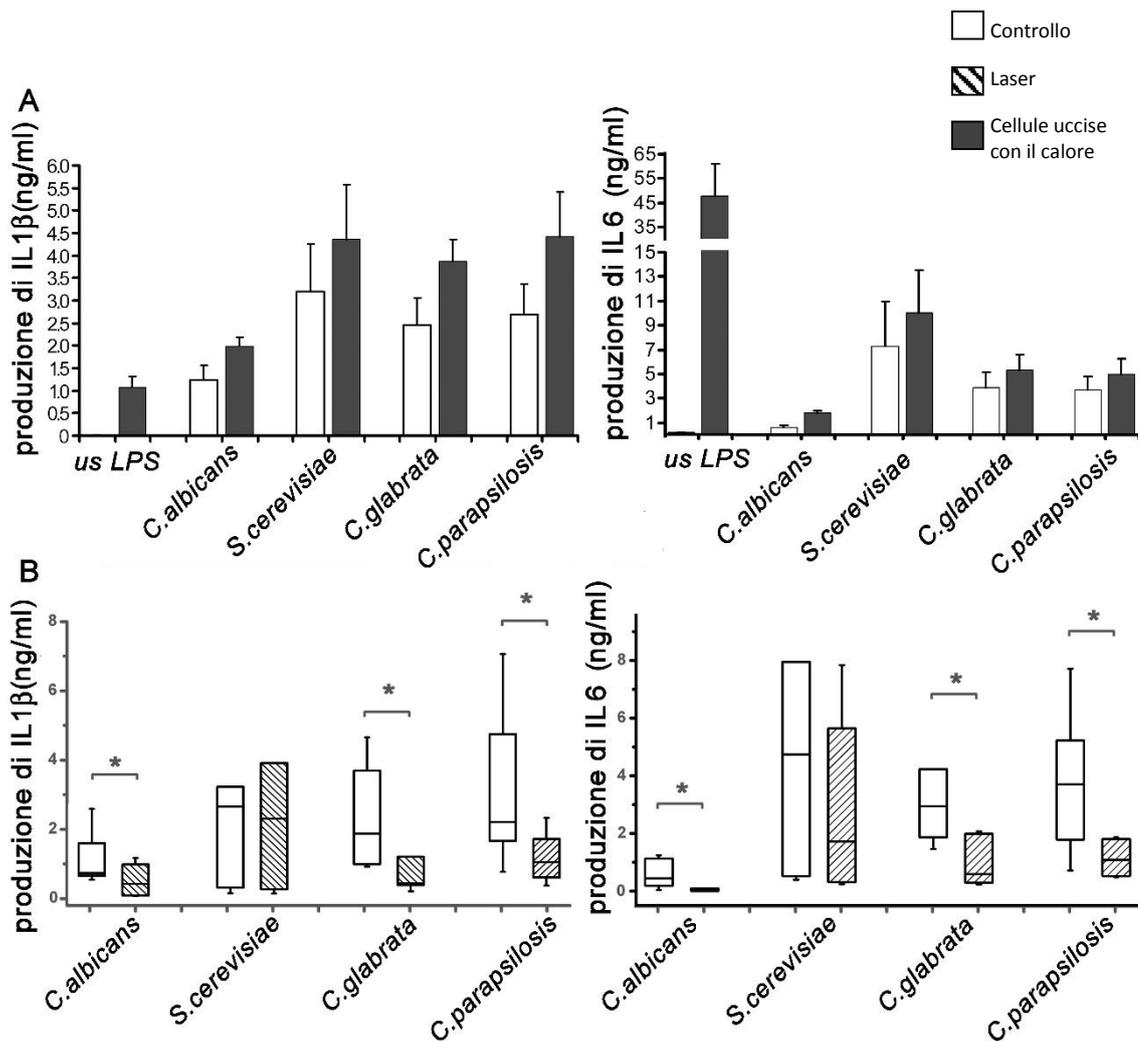


Fig.7 Produzione di IL1 β e IL6 da parte di cellule dendritiche stimulate con le specie fungine (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) non trattate (A) o trattate con il laser (B). L'incubazione con cellule uccise con il calore (95°C per 15 min) e la stimolazione con LPS (50 ng/ml) sono stati considerati come controlli positivi.

2.5. Valutazione della capacità delle cellule fungine di attivare i recettori di tipo Toll 2 e 4 in conseguenza al trattamento MLS

Il riconoscimento di *Candida sp.* da parte delle cellule del sistema immunitario è mediato da "Pattern Recognition Receptors" (PRRs) che includono i recettori di tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) e le lectine di tipo C ed S. L'attivazione di questi recettori innesca delle pathways che scatenano una risposta di tipo infiammatorio. Nelle infezioni fungine, i recettori di tipo Toll 4 sono i primi ad essere allertati dai componenti della parete fungina, che vengono riconosciuti come "non self". Il processo iniziale di riconoscimento della parete fungina induce anche l'esposizione di una strato più interno che viene

riconosciuto dal TLR2 in cooperazione con dectin-1. Alla luce di questi meccanismi, abbiamo pensato di andare a valutare se la radiazione laser inducesse, nelle specie fungine, delle alterazioni che compromettono la loro capacità di attivare i recettori TLR2 e TLR4. Per verificare questa ipotesi è stato effettuato un saggio di attività luciferasica su cellule HEK trasfettate con TLR2 e TLR4. Dai diagrammi ottenuti (Fig.8) osserviamo che, in tutte le specie considerate, i campioni trattati inducono un decremento della stimolazione del TLR4 rispetto ai campioni non trattati. La differenza, tuttavia, risulta significativa soltanto in *C. albicans*. Al contrario, non osserviamo differenze nella stimolazione del TLR2 da parte dei campioni trattati rispetto ai non trattati in tutte specie considerate (grafico non riportato).

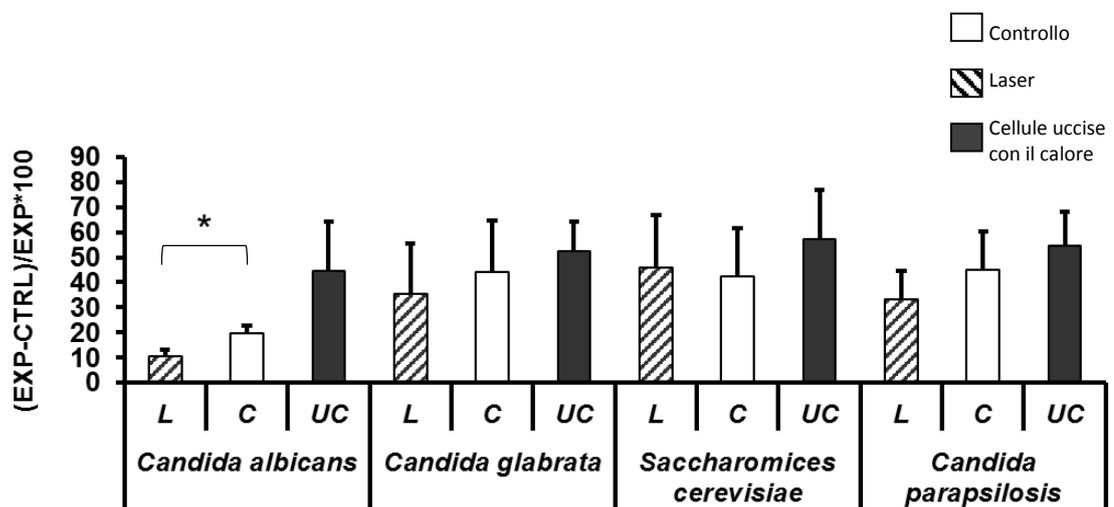


Fig.8 Indice di attivazione del recettore di tipo Toll 4 calcolato mediante saggio di luciferasi effettuato in cellule HEK-293-hTLR4 stimulate con cellule fungine (*S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) non trattate o trattate con il laser. L'incubazione con cellule uccise con il calore (95°C per 15 min) è stata considerata come controllo positivo.

3. APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Valutazione dell'effetto del trattamento MLS sulla componente infiammatoria e sulla riparazione tissutale delle lesioni orali

In letteratura sono presenti numerosi studi dove la laserterapia viene utilizzata per favorire la riparazione tissutale e accelerare la guarigione delle ferite. Gli studi dove il laser viene applicato per il trattamento delle mucositi orali, ad esempio, riportano risultati che ne dimostrano l'efficacia sulla regressione delle lesioni e sulla riduzione del grado della malattia. Anche se i meccanismi molecolari e cellulari non sono del tutto noti, sulla base degli studi in vitro e su modelli animali è stata avanzata l'ipotesi che la laserterapia possa favorire la riparazione tissutale controllando la risposta infiammatoria ed il comportamento dei fibroblasti, incrementando la sintesi di collagene e riattivando il microcircolo.

Per verificare questa ipotesi abbiamo condotto, in collaborazione con un medico veterinario, uno studio clinico in cui la laserterapia è stata applicata su gatti affetti da gengivostomatite cronica felina, patologia di natura infiammatoria che interessa la mucosa orale e la gengiva. Mediante l'analisi di campioni bioptici, prelevati nelle aree interessate prima ed in seguito al trattamento laser, è stato possibile effettuare un'analisi dello stato infiammatorio del tessuto.

3.1. Analisi istologica

L'esame dei campioni di mucosa orale del gruppo I (gruppo trattato con un protocollo che prevedeva una densità di energia pari a $0,32 \text{ J/cm}^2$), prelevati prima del trattamento, ha mostrato la presenza di un importante infiltrato infiammatorio, composto principalmente da linfociti e cellule mononucleate. Inoltre sono presenti alterazioni istopatologiche, da moderate a gravi, che consistono in assottigliamento ed ulcerazione di ampi tratti dell'epitelio superficiale. (Fig. 9A). Il trattamento laser non ha determinato cambiamenti apprezzabili di queste caratteristiche istopatologiche (Fig. 9B). Soltanto in 2 dei 5 soggetti trattati si è osservata una lieve riduzione dell'infiltrato infiammatorio. Queste valutazioni sono state confermate dall'analisi quantitativa (Tab. IV). L'esame dei campioni di mucosa

orale del gruppo II (gruppo trattato con un protocollo di trattamento che prevedeva 0,16 J/cm²), prelevati prima del trattamento, ha evidenziato la presenza di alterazioni istopatologiche da moderate a gravi, simili a quelle descritte nel gruppo I (Fig. 10A). In questo caso, tuttavia, il trattamento laser comporta un notevole miglioramento delle caratteristiche istopatologiche (Fig. 10B), che consiste principalmente nel ripristino o ricostituzione dell'integrità epiteliale e nella marcata riduzione dell'infiltrato infiammatorio nella lamina propria, che in 2 dei 5 soggetti di questo gruppo scompare quasi totalmente. L'analisi semi-quantitativa, anche in questo caso, conferma le osservazioni effettuate (Tab.V).

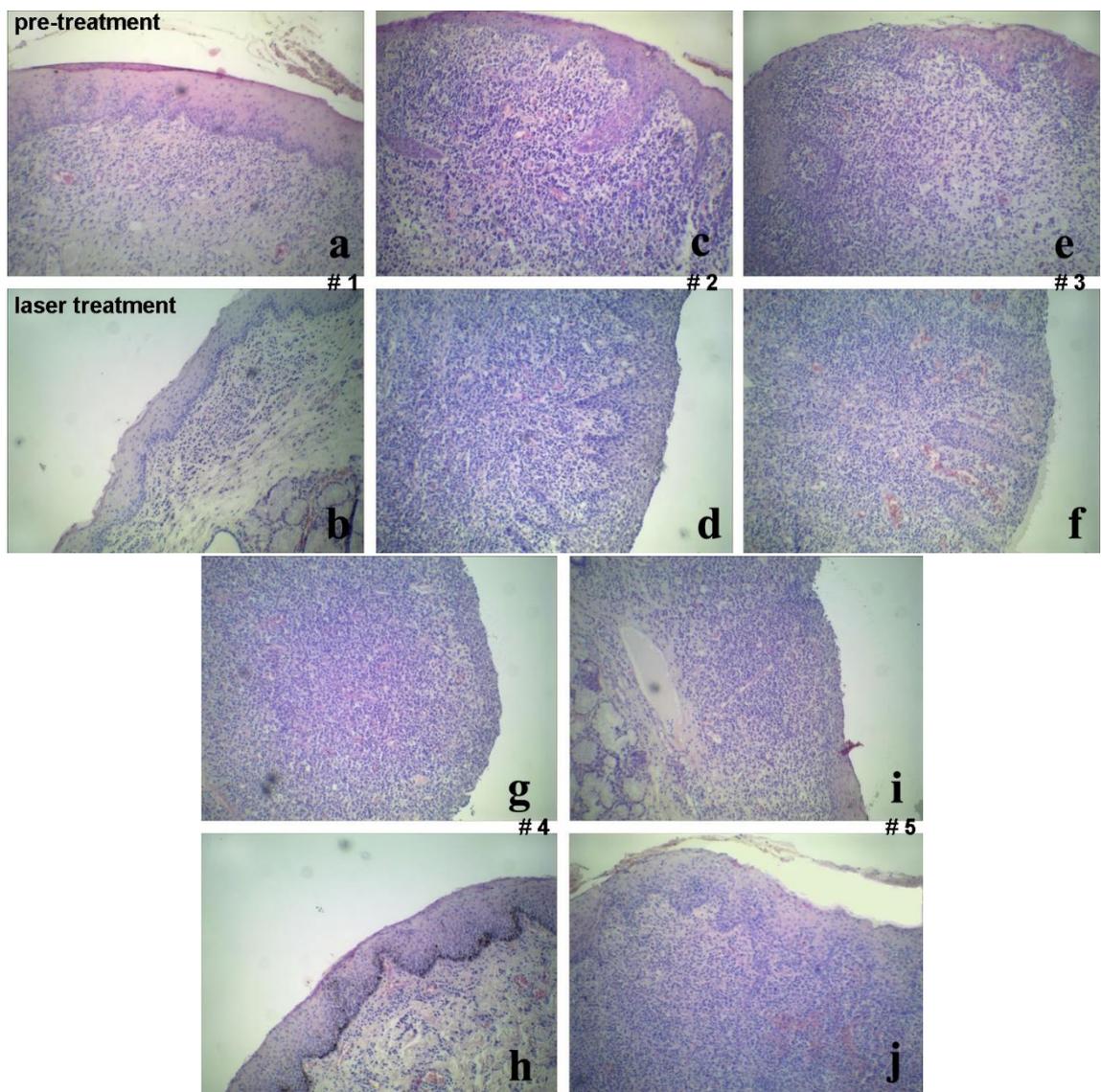


Fig.9 Sezioni di mucosa orale (gruppo I), prelevate prima (a,c,e,g,i) e dopo il trattamento laser (b,d,f,h,j), colorate con ematossilina-eosina. Ingrandimento 400X

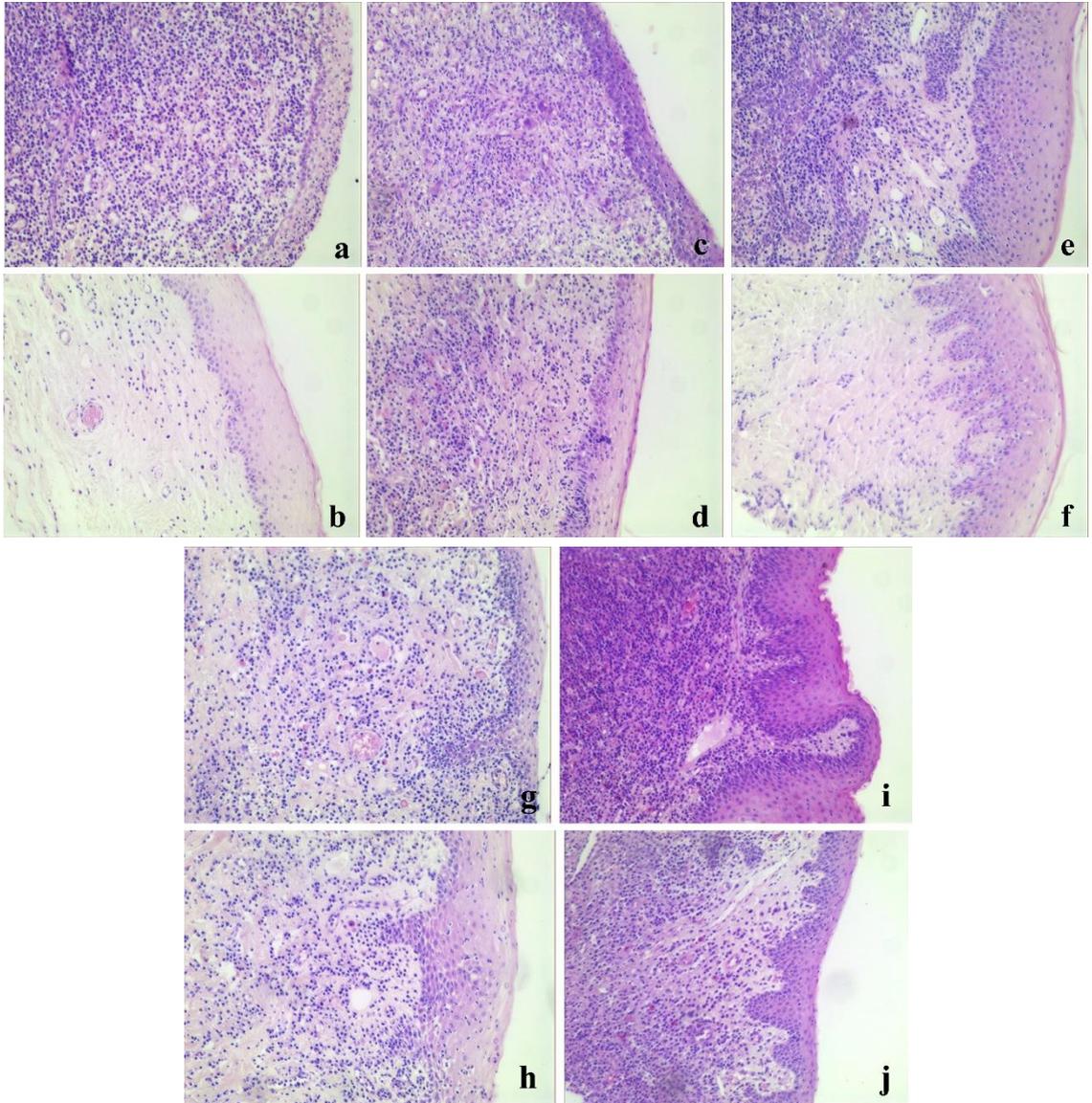


Fig.10 Sezioni di mucosa orale (gruppo II), prelevate prima (a,c,e,g,i.) e dopo il trattamento laser (b,d,f,h,j.), colorate con ematossilina-eosina. Ingrandimento finale 400X

| Soggetto | Prima del trattamento | | | Dopo il trattamento | | |
|----------|------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|
| | Epitelio di superficie | Infiltrato infiammatorio | Capillari sanguigni | Epitelio di superficie | Infiltrato infiammatorio | Capillari sanguigni |
| 1 | + | + / ++ | ++ | + | + | ++ |
| 2 | ++ / +++ | +++ | ++ | ++ | +++ | + / ++ |
| 3 | ++ / +++ | +++ | ++ | ++ / +++ | +++ | ++ |
| 4 | ++ / +++ | +++ | ++ | + / ++ | + | + / ++ |
| 5 | ++ / +++ | ++ | ++ | + / +++ | ++ | ++ |

Tab. IV Analisi semi-quantitativa gruppo I

| Soggetto | Prima del trattamento | | | Dopo il trattamento | | |
|----------|------------------------|--------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|
| | Epitelio di superficie | Infiltrato infiammatorio | Capillari sanguigni | Epitelio di superficie | Infiltrato infiammatorio | Capillari sanguigni |
| 1 | +++ | +++ | ++ | + | + / ++ | ++ |
| 2 | ++ | +++ | + | + | - | ++ |
| 3 | +++ | +++ / ++ | ++ | + | + / ++ | ++ |
| 4 | ++ / + | ++ / + | + | + | - | + |
| 5 | +++ | +++ / ++ | ++ | ++ | ++ / + | + |

Tab. V Analisi semi-quantitativa gruppo II

3.2. Analisi di immunofluorescenza

Per confermare i risultati della valutazione istologica, le sezioni ottenute dai campioni bioptici, prelevati prima e dopo il trattamento, sono state analizzate per l'espressione di cellule CD3 positive. Il CD3 viene considerato un marcatore immunocistochemico dei linfociti T. Questa cellule dell'immunità adattativa sono tra i principali protagonisti dei processi infiammatori. Questa analisi, effettuata mediante tecniche di immunofluorescenza, è stata condotta soltanto su i campioni di mucosa orale del gruppo II (gruppo trattato con densità di energia $0,16 \text{ J/cm}^2$). Dalla Fig. 11 possiamo osservare che il trattamento laser induce una marcata riduzione dell'espressione di cellule CD3 positive. Inoltre, nei campioni trattati è ben visibile la ricostituzione dell'epitelio (vedi frecce bianche).

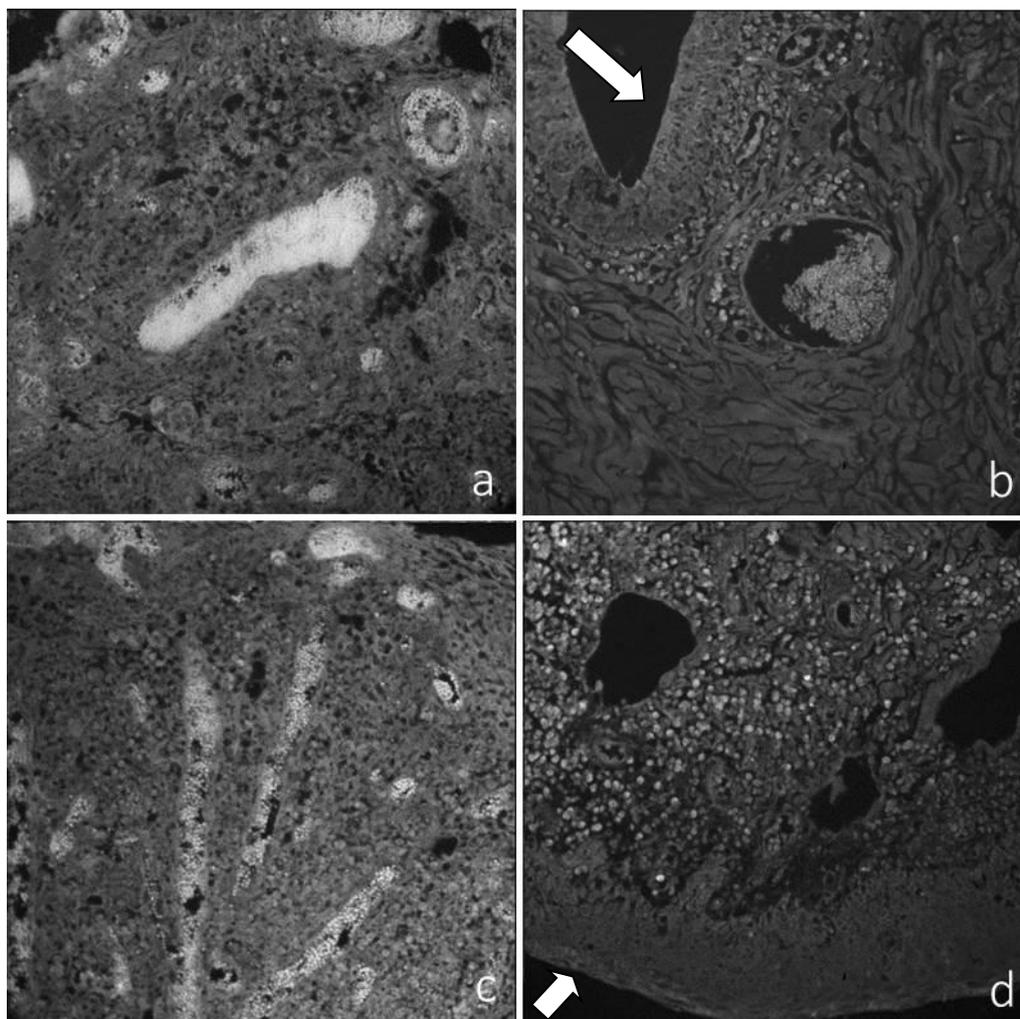


Fig.11 Analisi mediante tecniche di immunofluorescenza delle cellule CD3 positive in sezioni di mucosa orale (gruppo II), prelevata prima (a,c) e dopo il trattamento laser (b,d).

DISCUSSIONE

APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL LINFEDEMA POST-MASTECTOMIA. Discussione dei risultati sulla sicurezza della radiazione laser su colture di cellule tumorali.

Il sistema laser utilizzato in questo studio (MLS) è già ampiamente applicato in medicina sportiva e riabilitativa, dove è stata dimostrata la sua efficacia nel ridurre l'infiammazione e nel promuovere un rapido assorbimento dell'edema. Per questo motivo, questo sistema laser è stata considerato, con grande interesse, nella gestione del linfedema post-mastectomia. Anche se con il trattamento laser MLS non sono mai stati riportati effetti collaterali, l'esposizione alla radiazione nei pazienti oncologici richiede particolare attenzione e necessita di studi approfonditi, volti a capire se radiazione laser ed i parametri di trattamento scelti, possono influenzare il comportamento delle cellule tumorali. Questo studio *in vitro* riporta dei dati sul comportamento di cellule di adenocarcinoma mammario trattate con un sistema laser MLS. L'esposizione delle cellule alla radiazione laser è stata effettuata con una modalità a scansione, che viene spesso utilizzata nei pazienti quando si devono trattare aree estese, come nel caso del linfedema post-mastectomia.

Dai risultati ottenuti abbiamo osservato che, in seguito al trattamento laser, non si riscontrano differenze significative nei valori di vitalità e proliferazione dei fibroblasti e delle due linee tumorali, MCF-7 e MDA-MB361.

L'effetto di una radiazione laser nel rosso e nel vicino infrarosso (NIR) sulla vitalità e la proliferazione di colture di fibroblasti è stato ampiamente studiato, riportando tuttavia risultati discordanti [Frigo et al., 2010; Schartinger et al., 2011; Kreisler et al., 2002; Vinck et al., 2003; Pereira et al., 2002; Taniguchi et al., 2009; Hawkins et al., 2007]. Numerosi autori hanno osservato che la radiazione nel rosso e nel vicino infrarosso può indurre un aumento della proliferazione dei fibroblasti. Questo effetto risulta tuttavia dipendente da una serie di fattori: la lunghezza d'onda [Hawkins et al., 2007], la dose energetica [Frigo et al., 2010; Kreisler et al., 2002], l'origine della coltura (da embrioni, cutanea, gengivale, 3T3, ecc), le condizioni di coltura (per esempio, diversi esperimenti sono stati condotti su fibroblasti attivati) e lo stato fisiologico delle cellule [Frigo et al.,

2010]. La maggior parte degli studi riporta un aumento della proliferazione cellulare dopo 24 ore dall'esposizione, ma se vengono considerati tempi di osservazione più lunghi, i risultati sono molto controversi. In accordo con i nostri risultati, altri autori hanno osservato che l'effetto non perdura oltre le 24 ore [Vinck et al., 2003].

La letteratura che riguarda l'effetto del laser su colture di cellule tumorali presenta risultati ancora più controversi rispetto a quella sui fibroblasti. In questo caso, il confronto tra i vari studi è ancora più difficile, non solo per le diverse sorgenti e parametri utilizzati, ma anche per la varietà dei modelli sperimentali.

In uno studio del 2011, l'autore ha osservato che una radiazione laser con $\lambda=660$ nm non induceva un aumento della proliferazione cellulare nella linea SCC-25, derivante da carcinoma orale umano, bensì un decremento del numero di cellule a causa di apoptosi [Schartinger et al. 2011]. Pinheiro e collaboratori hanno evidenziato, in seguito all'esposizione a radiazione laser con $\lambda=670$ nm (densità di energia, 0,04-4,8 J/cm²), una maggiore proliferazione nelle cellule HEP-2, derivanti da tumore della laringe [Pinheiro et al., 2002]. Sroka e collaboratori hanno analizzato gli effetti di radiazioni con varie lunghezze d'onda e densità di energia su più linee cellulari, normali e tumorali. Dai risultati ottenuti, gli autori hanno osservato che, nelle cellule uroteliali normali (HCV29) e nelle cellule di carcinoma uroteliale (J82), il tasso mitotico risultava aumentato quando le cellule venivano irradiate con $\lambda=635$ nm e $\lambda=805$ nm ed una densità di energia compresa tra 4 e 8 J/cm². Al contrario, il tasso mitotico diminuiva ad una densità di energia pari a 20 J/cm². Dopo l'esposizione agli stessi trattamenti, in cellule di glioblastoma (U373MG), di carcinoma squamoso della mucosa gengivale (ZMKT) e di adenocarcinoma mammario (MCF7) gli autori hanno osservato una lieve diminuzione del tasso mitotico all'aumentare della densità di energia, indipendentemente dalla lunghezza d'onda [Sroka et al., 1999].

In una recente pubblicazione, Powell e collaboratori (2010) hanno valutato l'effetto della radiazione laser sui ritmi proliferativi di cellule derivanti da adenocarcinoma mammario (MCF-7), cellule derivanti da melanoma umano (MDA-MB -435S) e cellule epiteliali derivanti da tessuto mammario (SVCT e Bre80hTERT) In particolare, è stato studiato l'effetto dato da radiazioni laser con diversa lunghezza d'onda (780, 830, 904 nm) e diversa densità di energia (0,5-15 J/cm²). Le due linee epiteliali, SVCT e Bre80hTERT, hanno risposto diversamente al trattamento: la radiazione laser non induce alterazioni nei

ritmi proliferativi delle cellule Bre80hTERT mentre comporta un aumento significativo nei ritmi proliferativi delle cellule SVCT, le quali risultano sensibili a tutte le lunghezze d'onda testate. Il tasso di proliferazione delle cellule di melanoma MDA-MB435S non risulta variato in conseguenza all'esposizione ai diversi trattamenti laser. Anche se alcune condizioni di trattamento (combinazione di lunghezza d'onda e densità di energia) inducono un incremento della proliferazione delle cellule MCF-7 dopo una singola esposizione, è stato osservato che esposizioni multiple non inducono alcun effetto o nel caso, mostrano un andamento dose-risposta negativo. In particolare, l'emissione a 904 nm induce un aumento della proliferazione delle MCF-7 dopo un singolo trattamento e una diminuzione dopo tre trattamenti. Pertanto, i nostri risultati sono in accordo con quelli ottenuti da Powell e collaboratori [Powell et al., 2010] per quanto riguarda l'esposizione delle MCF-7 a tre trattamenti, ma non concordano sull'effetto di un singolo trattamento. Infatti, nei nostri esperimenti, sia il singolo che il triplo trattamento non inducono un incremento significativo della proliferazione delle MCF-7, come precedentemente riportato da Sroka [Sroka et. al., 1999]. I risultati discordanti potrebbero essere dovuti alla diversa sorgente laser e densità di energia applicata (abbiamo utilizzato un sistema laser caratterizzato dall'emissione simultanea di due lunghezze d'onda ed una densità di energia superiore a quella applicata da Powell e collaboratori).

Coerentemente con i dati ottenuti sulla vitalità e la proliferazione cellulare non abbiamo osservato, nei tre modelli considerati, alterazioni significative della progressione del ciclo cellulare e della soglia apoptotica.

In letteratura, gli articoli che riguardano gli effetti delle radiazioni laser nel rosso e nell'infrarosso sul ciclo cellulare sono relativamente pochi ed eterogenei, sia per quanto riguarda i protocolli sperimentali utilizzati sia per i risultati ottenuti. La maggior parte degli studi sono stati effettuati utilizzando sorgenti laser con emissione nella "banda rossa" dello spettro elettromagnetico (principalmente laser He-Ne con $\lambda=632$ nm) e con densità di energia inferiore o pari a 1 J/cm^2 . Con questi parametri, è stata osservata da alcuni autori, l'attivazione di geni regolatori delle fasi precoci del ciclo cellulare [Ben-Dov et al., 1999; Shefer et al., 2003]. Tuttavia, questo effetto sembra dipendere dal modello sperimentale e dalle sue condizioni, in quanto è stato osservato in colture cellulari derivanti da animali di 3 settimane di età ma non in colture derivanti da animali

più anziani [Shefer et al., 2003]. Risulta assai difficile confrontare questi risultati con i risultati del nostro studio, dal momento che è stato utilizzato un sistema laser caratterizzato dall'emissione simultanea di due lunghezze d'onda ed una densità di energia superiore.

In uno studio più recente, gli autori hanno dimostrato, in osteoblasti isolati da cranio di topo, che la radiazione laser infrarossa ($\lambda=905$ nm; densità di energia $3,75$ J/cm²) induce l'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M attraverso la upregolazione dei markers phospho-p53 e 14-3-3 σ . Questo effetto, osservato 12 ore dopo l'irraggiamento, scompare a 24 e 48 ore. Densità di energia pari a $1,25$ e $6,25$ J/cm² non hanno indotto alcun effetto sulla progressione del ciclo cellulare [Fukurara et al., 2002]. Le condizioni di trattamento utilizzate da Fukuhara sono comparabili con quelle del nostro studio, ed i risultati che l'autore riporta, sono in accordi con i nostri: in entrambi gli studi non si sono osservate differenze significative sulla progressione del ciclo cellulare a 24 ore dal trattamento. L'arresto temporaneo del ciclo cellulare osservato da Fukuhara, è limitato all'osservazione fatta a 12 ore dal trattamento effettuato con un densità di energia pari a $3,75$ J/cm².

In letteratura sono riportati vari studi sull'effetto del trattamento laser sull'apoptosi. In uno studio del 2013, dove veniva valutato l'effetto di 3 diverse radiazioni laser infrarosse su una coltura di fibroblasti dermici umani, è stato osservato che la radiazione con $\lambda=2940$ nm comporta una inibizione dell'attività mitocondriale ed induce necrosi ed apoptosi. L'emissione con $\lambda=830$ nm e quella con $\lambda=980$ nm, al contrario, promuovono l'attività mitocondriale e, in accordo con i nostri risultati, non influenzano il processo apoptotico [Crisan et al., 2013]. In un altro studio, gli autori hanno dimostrato che il trattamento laser, effettuato con una radiazione con $\lambda=670$ nm, riduce significativamente tre diversi indici di apoptosi, in particolare l'attivazione della caspasi 3, l'esposizione delle fosfatidiserine sul lato esterno della membrana plasmatica ed il rilascio, da parte dei mitocondri, di citocromo c nel citosol.

Mentre gli effetti sull'apoptosi dati dalle terapie fotodinamiche sono stati largamente studiate e dimostrati [Oleinick et al., 2002; Yoo et al., 2011], l'impatto diretto della radiazione laser sull'apoptosi e sul ciclo cellulare delle cellule tumorali è stato poco studiato ed i risultati ottenuti sono discordanti. In uno studio effettuato sulla linea cellulare

SCC-25, derivante da carcinoma orale, l'autore ha osservato che la radiazione laser con $\lambda=660$ nm induce apoptosi, rallenta la progressione del ciclo cellulare e, di conseguenza, la proliferazione cellulare [Schartinger et al., 2012]. In un altro studio, effettuato sempre sulla linea cellulare SCC-25 e su altre linee displastiche (DOK) e neoplastiche (SCC9), gli autori hanno osservato che il trattamento laser ($\lambda=660$ e $\lambda=780$ nm, densità di energia 2,05, 3,07 o 6,15 J/cm²) poteva aumentare o diminuire la proliferazione cellulare e indurre o no l'apoptosi, a seconda della dose energetica e del tipo di cellule [Sperandio et al., 2013]. L'aumento di apoptosi risultava collegato ai livelli di pAkt, in quanto è stato osservato che il trattamento laser è in grado di modulare la via Akt/mTOR/CyclinD1, via di segnale di cui è nota la correlazione con l'aggressività dei tumori di testa e collo. In accordo con questo studio, Gomez Henriques e collaboratori hanno recentemente dimostrato che la radiazione laser ($\lambda=660$ nm, densità di energia 1 J/cm²) promuove la proliferazione cellulare e la capacità invasiva delle cellule SCC-25. Tuttavia, questo effetto non risulta significativo con una densità di energia pari a 0,5 J/cm² [Gomez Henriques et al., 2014].

Pertanto, sulla base dei risultati ottenuti utilizzando la stessa linea cellulare e la stessa lunghezza d'onda di radiazione, ma diversi valori di densità di energia e modalità di esposizione, Schartinger [2012] ha affermato che la terapia laser non ha effetti sulla progressione tumorale mentre Sperandio [2013] e Gomes Henriques [2014] sostengono che, a seconda dei parametri di trattamento, il laser può indurre un aumento di aggressività del tumore. Queste differenze potrebbero essere spiegate sulla base dei risultati ottenuti da Huang e collaboratori [2009] nella linea cellulare ASTC-a-1, linea derivante da adenocarcinoma polmonare umano. L'autore ha osservato che, a dosi relativamente basse (20 J/cm²), la radiazione laser con $\lambda=632$ nm non innesca alcuna risposta cellulare, mentre induce un aumento della proliferazione a maggiore densità di energia. A dosi molto alte (160 J/cm²) il trattamento laser interferisce negativamente con il ciclo cellulare, inibisce la proliferazione e induce apoptosi.

Inoltre, sempre nella linea ASTC-a-1, è stato dimostrato che la radiazione laser ($\lambda=632,8$ nm), a densità di energia superiori a 60 J/cm², induce apoptosi in modo fluensa-dipendente. Il processo avviene in conseguenza all'attivazione della caspasi 3 [Wang et al., 2005], a sua volta indotta dalla produzione di ROS e attivazione del poro di transizione

della permeabilità mitocondriale [Wu et al., 2009]. Altri autori riportano che l'apoptosi ROS-mediata, indotta nelle cellule ASTC-1 da alti valori di densità di energia (120 J/cm^2), è conseguente all'attivazione della via di segnale Akt / GSK3 β , che a sua volta va ad attivare la proteina pro-apoptotica Bax [Huang et al. 2011]. In uno studio molto recente, la capacità di una data radiazione laser ($\lambda=632,8$ e densità di energia 120 J/cm^2) di indurre apoptosi in cellule tumorali è stata utilizzata per lo sviluppo di una nuova modalità di trattamento del tumore in un modello murino [Wu et al. 2014]. In questo studio la radiazione laser risultava efficace nell'abbattere le cellule tumorali attraverso la produzione di ROS e l'inattivazione delle citocromo c ossidasi.

Il confronto tra i nostri risultati e quelli riportati da altri autori sull'effetto della radiazione laser sull'apoptosi e sul ciclo cellulare è molto difficile, poichè i modelli sperimentali ed i parametri utilizzati per il trattamento sono spesso molto diversi.

Tuttavia, cercando di riassumere i risultati presenti in letteratura, abbiamo osservato che alcune condizioni di trattamento, in particolare quelle caratterizzate da radiazioni di lunghezze d'onda nel rosso e nell'infrarosso somministrate a bassa densità di energia ($0,5-5 \text{ J/cm}^2$), possono influenzare la progressione del ciclo cellulare e promuovere la proliferazione. L'effetto è dose-dipendente e generalmente scompare all'aumentare della densità di energia ($>15 \text{ J/cm}^2$). Valori di densità di energia $>60 \text{ J/cm}^2$ inducono apoptosi. I risultati di questo studio si inseriscono bene nel quadro complessivo che emerge dalla letteratura. Infatti, con le condizioni scelte ($\lambda=808 \text{ nm} + \lambda=905 \text{ nm}$, densità di energia 27 J/cm^2), non abbiamo osservato alterazioni significative del ciclo cellulare, dei ritmi proliferativi e dell'apoptosi, sia nelle due linee tumorali che nelle colture di fibroblasti. Per quanto riguarda la "cloning efficiency", dai dati ottenuti abbiamo osservato che le cellule MCF-7 sono capaci di formare colonie mentre l'altra linea, MDA-MB361, nonostante il potenziale metastatico, non ha questa capacità, probabilmente a causa di un difetto nell'adesione [Mori et al., 2009]. I fibroblasti, come era atteso, non formano colonie. Il trattamento laser non altera la "cloning efficiency" delle due linee tumorali: i risultati dimostrano che, nei campioni trattati, la percentuale di colonie formate dalle cellule MCF-7 non cambia, così come la inability delle cellule MDA-MB361 a formare colonie. Discutere questo dato risulta difficile, perché, per quanto è di nostra conoscenza,

ancora non era mai stato studiato l'effetto del laser sulla cloning efficiency di cellule tumorali.

In conclusione, i nostri risultati dimostrano che la radiazione laser MLS, con i parametri utilizzati in questo studio, non induce effetti significativi sul comportamento delle due linee tumorali derivanti da adenocarcinoma della mammella.

Sebbene uno studio *in vitro* non possa essere considerato rappresentativo di ciò che accade *in vivo*, i risultati ottenuti sono incoraggianti riguardo alla sicurezza di una potenziale applicazione del trattamento laser nella gestione del linfedema post-mastectomia.

Tuttavia, anche se i dati sembrano escludere la possibilità che il trattamento utilizzato in questo studio alteri il comportamento di eventuali cellule tumorali residue, gli effetti a lungo termine non sono stati ancora valutati e non possono essere esclusi. Pertanto, è evidente l'importanza di approfondire questi studi, volti ad una maggiore comprensione degli effetti della radiazione laser e dei differenti parametri di trattamento sulle cellule tumorali.

Dalla letteratura è evidente come non sia possibile trarre indicazioni di tipo generale riguardo l'effetto della radiazione laser sul comportamento delle cellule tumorali. In base al modello cellulare e ai parametri di trattamento utilizzati, principalmente la lunghezza d'onda, ma anche la densità di energia e la modalità di somministrazione, gli studi dimostrano che il trattamento laser può avere effetti contrastanti. Per tale motivo, l'uso della laserterapia nei pazienti oncologici richiede estrema cautela e studi indirizzati alla specifica applicazione, dove si dovrebbe valutare, in appropriati modelli sperimentali, la sicurezza e l'efficacia del trattamento laser che verrà poi utilizzato nel paziente.

APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Discussione dei risultati sugli effetti del laser sulla sopravvivenza e sul potenziale infiammatorio di specie patogene coinvolte nella patogenesi delle mucositi orali.

Da qualche anno, la laserterapia viene applicata per la prevenzione ed il trattamento delle mucositi orali che molto spesso colpiscono i pazienti che si sottopongono a chemio o radioterapia. Diversi studi in letteratura, effettuati con varie sorgenti e modalità di trattamento, dimostrano l'efficacia della terapia laser nel ridurre la sintomatologia clinica di questa patologia. Tuttavia, le conoscenze riguardo l'effetto diretto del laser sui microrganismi patogeni, responsabili delle infezioni a carico della mucosa, sono assai limitate. Come descritto precedentemente, in seguito ai trattamenti oncologici la mucosa della bocca è soggetta ad alterazioni che la rendono maggiormente predisposta a infezioni batteriche, fungine o virali.

In questo studio è stato valutato l'effetto del sistema laser MLS sulla sopravvivenza e sul potenziale infiammatorio di alcune specie di *Candida sp.* che risultano più frequentemente coinvolte nella patogenesi della candidosi oro-faringea (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*).

I primi esperimenti di questo studio sono stati effettuati per valutare, in *C. albicans* e *S. cerevisiae*, l'effetto di quattro protocolli di trattamento laser, diversi per tempo di esposizione e energia totale rilasciata. Da queste prove, è stato selezionato il trattamento che prevedeva 200 J di energia totale rilasciata (trattamento P3), perché è risultato maggiormente efficace nel ridurre il numero di CFU della specie patogena. Il protocollo di trattamento P3 è stato poi utilizzato in tutti gli esperimenti successivi.

Dai risultati ottenuti su varie specie di *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) è stato osservato che il trattamento P3 influisce significativamente sulla sopravvivenza delle specie patogene mentre lascia inalterata quella di *S. cerevisiae*.

La produzione di ROS, derivante dall'assorbimento della radiazione laser a livello mitocondriale, è stata proposta come uno dei principali meccanismi molecolari alla base dell'azione fotoinattivante della laserterapia sulle specie microbiche, tra le quali *C. albicans* e *Staphylococcus* [Bornstein et al., 2009]. In effetti, l'aumentata produzione di

ROS potrebbe essere ipoteticamente responsabile dell'apoptosi osservata nei nostri esperimenti. Questo meccanismo, tuttavia, non riesce a spiegare il diverso risultato osservato in *Candida sp.* ed in *S. cerevisiae* per quanto riguarda la sopravvivenza, dato che non sono riportate differenze significative nell'attività mitocondriale di queste due specie fungine. La diversa sensibilità delle specie fungine al trattamento laser potrebbe risiedere, almeno in parte, nelle caratteristiche strutturali e chimico-fisiche coinvolte nella sopravvivenza e nella virulenza del patogeno *Candida sp.* La composizione della parete fungina varia tra le diverse specie e anche tra ceppi diversi della stessa specie. Inoltre, presenta molte variazioni a seconda della fase di crescita della cellula fungina, ad esempio tra la fase di lievito e la fase di ifa. La transizione da lievito a ifa, che si verifica in *Candida sp.* ma non in *S. cerevisiae*, porta ad un notevole aumento della distribuzione ed esposizione delle adesine e dei mannani a loro associati [Beaussart et al., 2012; Cheng et al., 2011].

E' possibile ipotizzare che il bersaglio della radiazione laser siano alcune componenti strutturali della cellula fungina, le quali vengono maggiormente esposte durante la transizione da lievito a ifa. Questa idea è supportata dai risultati di alcuni esperimenti preliminari da noi effettuati (dati non riportati) in cui si è osservato che colture di *Candida sp.* mantenute in medium Sabouraud, che inibisce la formazione di ife, non risultavano sensibili al trattamento, in termini di sopravvivenza.

Oltre agli effetti osservati sulla sopravvivenza di *Candida sp.*, i risultati di questo studio dimostrano che il trattamento laser influenza anche il potenziale infiammatorio di *Candida sp.*, mentre lascia inalterato quello di *S. cerevisiae*. In accordo con quanto riportato in un precedente studio [Dogan et al., 1999], abbiamo rilevato importanti differenze nella produzione di due citochine infiammatorie (IL-1 β e IL-6) da parte di cellule dendritiche stimulate con le specie fungine. In particolare, abbiamo osservato che *C. albicans* e *S. cerevisiae* inducono la più bassa e la più alta produzione delle citochine IL-1 β e IL-6, rispettivamente. La struttura della parete fungina è composta da chitina, β -glucani e mannoproteine, proteine legate covalentemente ai mannani tramite legame estere (O-mannani) o tramite gruppo ammidico (N-mannani). Le cellule dell'immunità innata, comprese le cellule dendritiche, riconoscono i pattern molecolari associati ai funghi patogeni (PAMP) attraverso i recettori di tipo Toll (TLR) ed i recettori delle lectine

di tipo C e S, che insieme costituiscono i “Pattern Recognition Receptors” (PPRs) [Cheng et al., 2012]. Poiché il processo di formazione delle ife è accompagnato da un’ aumentata esposizione dei mannani, è possibile che siano coinvolti molteplici pattern di riconoscimento (PRR) [Beaussart et al., 2012; Cheng et al., 2011]. Anche in questo caso, il dimorfismo che caratterizza *Candida sp.*, ma non *S. cerevisiae*, potrebbe spiegare la differenza osservata nella produzione di citochine da parte delle cellule dendritiche. Recentemente, tuttavia, la causa del minore potenziale infiammatorio di *C. albicans* rispetto a *S. cerevisiae* è stata attribuita ad un mannano (β -1,2-mannoside) presente soltanto nella specie patogena [Mille et al., 2008]. Mutanti di *C. albicans*, privi del β -1,2-mannoside, inducono una produzione di citochine infiammatorie molto più elevata rispetto al ceppo wild-type [Ueno et al., 2013]. Queste strutture possono spiegare il minore potenziale infiammatorio di *Candida sp.* rispetto a *S. cerevisiae* in maniera indipendente dallo stato morfologico [Ueno et al., 2013]. Alla luce di questi dati, abbiamo valutato l’ipotesi che il mannano β -1,2-mannoside, potesse essere un “bersaglio” della radiazione laser. Colture di cellule dendritiche sono state stimolate con cellule di *S. cerevisiae* e *Candida sp.* non trattate o trattate con il laser. Dall’analisi effettuata sulla produzione di IL-1 β e IL-6 da parte delle cellule dendritiche è stato osservato che la stimolazione con cellule di *Candida sp.* trattate con il laser induce, da parte delle cellule dendritiche, una minore produzione di IL1 β e IL-6, rispetto alla stimolazione effettuata con le cellule di *Candida sp.* non trattate con il laser. In *S. cerevisiae* l’esposizione alla radiazione laser non induce differenze nella produzione di IL1 β e IL-6 da parte delle cellule dendritiche. Questa ipotesi tuttavia deve essere ulteriormente approfondita. Dai risultati ottenuti abbiamo inoltre osservato che il trattamento laser induce una leggera diminuzione della capacità di *Candida sp.* di attivare le vie di segnale che vengono innescate dal TLR4. Questo effetto non è stato osservato in *S. cerevisiae*. L’attivazione del TLR2 non viene influenzata dalla radiazione laser, suggerendo ancora una volta che l’azione del laser non coinvolge gli strati più profondi della parete fungina, ma piuttosto quelli più esterni.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti dimostrano che il trattamento laser utilizzato in questo studio è in grado di indurre apoptosi in *Candida sp.* e alterare la sopravvivenza delle cellule fungine. Si ipotizza che trattamento laser induca delle modificazioni a livello della parete fungina e comportamenti delle alterazioni nella produzione di ROS e nella permeabilità

della membrana. Queste modificazioni, a carico della cellula fungina, limitano il rilascio di citochine pro-infiammatorie e aumentano la possibilità di fagocitosi da parte di macrofagi e cellule dendritiche.

Il conclusione, il trattamento laser proposto in questo studio, ha effetto sulla sopravvivenza ed il potenziale infiammatorio delle specie patogene *Candida sp.* E' ipotizzabile che questo effetto sia da attribuire a modificazioni strutturali a carico dei mannani della parete fungina. Questa ipotesi verrà approfondita con studi futuri.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, il laser può rappresentare un valido coadiuvante terapeutico nel trattamento delle mucositi orali.

APPLICAZIONE DELLA LASERTERAPIA NEL TRATTAMENTO DELLE MUCOSITI ORALI. Discussione dei risultati sull'effetto antinfiammatorio e stimolante la riparazione dei tessuti della radiazione laser

Lo studio effettuato per valutare l'effetto del laser sulla componente infiammatoria ed i processi di rigenerazione tissutale è stato effettuato su gatti affetti da gengivostomatite felina (FGCS). E' stata selezionata questa patologia perché rappresenta un ottimo modello di lesione a carico della mucosa orale. La gengivostomatite felina (FGCS) infatti, è una patologia di natura infiammatoria che interessa la mucosa orale e la gengiva. L'eziologia di questa patologia è incerta, si possono riconoscere vari agenti eziologici che, sia singolarmente che in combinazione, possono creare l'infiammazione. L'obiettivo delle terapie proposte per questa patologia è quello di eliminare l'infiammazione, ma spesso l'intervento o il trattamento effettuato non si rivela sempre efficace e risolutivo per tutti i soggetti, questo probabilmente anche a causa della eziologia incerta di questa patologia. La riduzione della carica batterica del cavo orale, abbassando lo stimolo infiammatorio, rimane uno dei punti basilari del trattamento. La terapia chirurgica, che si basa sull'estrazione dei denti dell'animale, rappresenta infatti uno dei metodi terapeutici maggiormente efficaci.

I dati clinici, raccolti nello studio, hanno evidenziato che il trattamento laser comporta un notevole miglioramento dei sintomi della patologia. Questo effetto, tuttavia, è stato osservato soltanto con una delle due modalità testate; il protocollo di trattamento che prevedeva una minore densità di energia è infatti risultato più efficace. Poiché la diversa sensibilità alla densità di energia non è in questo caso confrontabile con dati presenti in letteratura, l'effetto osservato sarà oggetto di ulteriori studi.

Gli effetti indotti dal trattamento laser a minore densità di energia, sono simili a quelli osservati in uno studio dove i soggetti con FGCS venivano trattati con terapia chirurgica [Bellei et al., 2008]. Tuttavia, l'aspetto rilevante che si evidenzia dallo studio di questo progetto è che il trattamento laser è risultato efficace nel ridurre la sintomatologia in soggetti precedentemente trattati con altre terapie, tra cui la terapia chirurgica. Alla luce di questo risultato è stata avanzata l'ipotesi che la radiazione laser svolga, sulla base degli effetti terapeutici, un'azione sinergica sulle varie componenti di questa patologia.

I risultati ottenuti dalla analisi istologica e dall'analisi di microscopia di fluorescenza sono concordi con i dati clinici. L'esame dei campioni di mucosa orale del gruppo trattato con la radiazione a minore densità di energia, ha riportato un notevole miglioramento delle caratteristiche istopatologiche, che consiste principalmente nella ricostituzione dell'epitelio e nella marcata riduzione dell'infiltrato infiammatorio. I risultati ottenuti dall'analisi istologica sono molto simili a quelli osservati da Gupta e collaboratori in studio dove è stato valutato l'effetto del laser in modelli di ustione termica nel ratto. In seguito ad un radiazione laser con $\lambda=904$ nm e densità di energia pari a $0,2$ J/cm², gli autori hanno osservato, la totale ricostituzione dell'epitelio, maggiore fibrogenesi, neo-vascularizzazione e deposizione di fibre collagene. Gli autori hanno inoltre osservato, in seguito al trattamento, un minore infiltrato infiammatorio [Gupta et al., 2014]. Sempre in un modello di lesione nel ratto, Khoshvaghti e collaboratori hanno dimostrato che la radiazione laser infrarossa diminuisce significativamente il numero totale di mastociti presenti durante le fasi di proliferazione e rimodellamento [Khoshvaghti et al., 2011].

Dalle analisi effettuate mediante tecniche di immunofluorescenza, abbiamo osservato che il trattamento laser con minore densità di energia, induce una marcata riduzione dell'espressione di cellule CD3 positive. Il CD3 viene considerato un marcatore

immunoistochimico dei linfociti T. Queste cellule dell'immunità adattativa sono tra i principali protagonisti dei processi infiammatori.

La minore espressione di cellule CD positive nei campioni trattati dimostra, sebbene in modo indiretto, che il trattamento laser esercita un'azione antinfiammatoria. Questo risultato è supportato dalle evidenze emerse in un recente studio, dove gli autori [Monici et al., 2013] hanno dimostrato che lo stesso trattamento laser utilizzato in questo studio, induce un aumento della proteina antinfiammatoria NLRP10. NLRP10 inibisce l'attività della caspasi 1 e del complesso PYCARD, che promuovono la maturazione delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β e IL-18. Pertanto, NLRP10 inibendo la produzione di IL-1 β e IL-18 riduce l'infiammazione.

Considerato l'effetto sulla sopravvivenza degli agenti patogeni e l'importante azione sulla componente infiammatoria, la terapia laser risulta un trattamento efficace per la gestione della gengivostomatite felina.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, possiamo concludere che:

1. Nello parte di progetto focalizzata sulla valutazione della sicurezza della radiazione laser nel trattamento del linfedema post-mastectomia, la sorgente utilizzata e le condizioni di trattamento proposte non hanno indotto effetti significativi sul comportamento delle due linee tumorali derivanti da adenocarcinoma della mammella, per quanto riguarda vitalità, proliferazione, apoptosi, progressione del ciclo cellulare e cloning efficiency.
2. Nella parte di progetto focalizzata sull'applicazione del laser nelle mucositi orali, lo studio riguardo gli effetti del trattamento laser sulle specie fungine ha dimostrato che, la sorgente utilizzata e le condizioni di trattamento proposte, sono efficaci nell'indurre alterazione della sopravvivenza e del potenziale infiammatorio di *Candida sp.*, principali responsabili delle infezioni che molto spesso interessano le mucositi del cavo orale.
3. Nella parte di progetto focalizzata sull'applicazione del laser nelle mucositi orali, lo studio effettuato per valutare gli effetti del trattamento laser sulla componente infiammatoria e sui processi riparativi ha evidenziato che, la sorgente utilizzata e le condizioni di trattamento proposte, sono efficaci nel ridurre l'infiammazione e promuovere la rigenerazione dell'epitelio.

Sebbene questo progetto abbia valutato soltanto alcuni aspetti dei due casi di complicazione secondaria alle terapie oncologiche, i risultati ottenuti sono confortanti e supportano il possibile utilizzo della laserterapia nel trattamento del linfedema post-mastectomia e delle mucositi orali. Tuttavia, come più volte sottolineato, sono necessari ulteriori studi, volti ad una maggiore comprensione dei meccanismi alla base degli effetti del laser, e studi indirizzati alle specifiche applicazioni, dove la sicurezza e l'efficacia del trattamento laser che verrà poi utilizzato nel paziente viene valutata, in appropriati modelli sperimentali.

Alla luce delle evidenze cliniche e sperimentali e considerato che la laserterapia è indolore, non è invasiva ed è di facile somministrazione, questo trattamento potrebbe rappresentare, nella gestione delle complicazioni conseguenti alle terapie oncologiche, una valida terapia di supporto in grado di produrre miglioramenti significativi nella qualità della vita dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Abramoff MM, Lopes NN, Lopes LA, Dib LL, Guilherme A, Caran EM, Barreto AD, Lee ML, Petrilli AS. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced oral mucositis in young patients. *Photomed Laser Surg.* 2008 Aug;26(4):393-400. doi: 10.1089/pho.2007.2144.
2. Abreu ME, Viegas VN, Pagnoncelli RM, de Lima EM, Farret AM, Kulczynski FZ, Farret MM. Infrared laser therapy after surgically assisted rapid palatal expansion to diminish pain and accelerate bone healing. *World J Orthod.* 2010 Fall;11(3):273-7.
3. Ahmed Omar MT, Abd-El-Gayed Ebid A, El Morsy AAM, Treatment of post-mastectomy lymphedema with laser therapy: double blind placebo control randomized study, *J Surg Res.* 165 (2011) 82-90
4. Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, Munin E, Costa MS. Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *J Photochem Photobiol B.*, 2007 Nov 12;89(1):50-5.
5. Almeida-Lopes L., Rigau J., Zangaro R.A., Guidugli-Neto J., Jaeger M.M. 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(2):179-84.
6. Amaral A.C., Parizotto N.A., salvini T.F. Dose-dependency of low-energy HeNe laser effectin regeneration of skeletal muscle in mice. (2001) *Laser Med Sci* 16, 44-451.
7. Armer JM, Radina ME, Porock D, Culbertson SD. Predicting breast cancer-related lymphedema using self-reported symptoms. *Nurs Res.* 2003;52:370-379
8. Badger CM, Peacock JL, Mortimer PS (2000) A randomized,controlled, parallel-group clinical trial comparing multilayer bandaging followed by hosiery versus hosiery alone in the treatment of patients with lymphedema of the limb. *Cancer* 88:2832–8327
9. Baratto L, Calzà L, Capra R, Gallamini M, Giardino L, Giuliani A, Lorenzini L, Traverso S. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci.* 2011 Jan;26(1):103-12. doi: 10.1007/s10103-010-0837-2. Epub 2010 Sep 18.

10. Beaussart A, Alsteens D, El-Kirat-Chatel S, et al. Single-molecule imaging and functional analysis of Als adhesins and mannans during *Candida albicans* morphogenesis. *ACS Nano* 2012; 6:10950-64.
11. Bellei E, Dalla F, Masetti L, Pisoni L, Joechler M. Surgical therapy in chronic feline gingivostomatitis (FCGS). *Vet Res Commun*. 2008 Sep;32 Suppl 1:S231-4. doi: 10.1007/s11259-008-9153-8.
12. Ben-Dov N, Shefer, G Irintchev A, Wernig A, Oron U, Halevy O, Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro, *Biochim Biophys Acta.*, 1448(3) (1999) 372-80
13. Bensadoun RJ, Franquin JC, Ciais G, Darcourt V, Schubert MM, Viot M, et al. Low-energy He/Ne laser in the prevention of radiation-induced mucositis. A multicenter phase III randomized study in patients with head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 1999;7:244–52
14. Bibikova A., Belkin V., Oron U. Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl)*. (1994); 90,597-602.
15. Bischoff R. 1986. A satellite cell mitogen from crushed adult muscle. *Dev Biol*, 115:140-147.
16. Bischoff R., Heintz C. 1994. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* 201:41-54.
17. Bjordal JM, Bensadoun RJ, Tunè J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RA. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2011 Jun 10.
18. Bornstein E, Hermans W, Gridley S, Manni J. Near-infrared photoinactivation of bacteria and fungi at physiologic temperatures. *Photochem Photobiol* 2009; 85:1364-74
19. Camy G, Fahrenkrug P, Gracis M, et al. Proposed guidelines on the management of feline chronic gingivostomatitis (FCGS) syndrome: A consensus statement, September 2010.

20. Carati CJ, Anderson SN, Gannon BJ, Piller NB, Treatment of Postmastectomy Lymphedema with Low-Level Laser Therapy. A Double Blind, Placebo-Controlled Trial, *Cancer*. 98(6) (2003) 1114-22
21. Carvalho PA, Jaguar GC, Pellizzon AC, Prado JD, Lopes RN, Alves FA. Evaluation of low-level laser therapy in the prevention and treatment of radiation-induced mucositis: a double-blind randomized study in head and neck cancer patients. *Oral Oncol*. 2011 Dec;47(12):1176-81. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.021. Epub 2011 Sep 10.
22. Chen CH., Hung HS., Hsu S.H. Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via P13K pathway. *Lasers Surg Med*. 2008 Jan;40(1):46-54.
23. Cheng SC, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect Immun* 2012; 80:1304-13.
24. Cheng SC, van de Veerdonk FL, Lenardon M, et al. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 2011; 90:357-66.
25. Chermetz M, Gobbo M, Ronfani L, Ottaviani G, Zanazzo GA, Verzegnassi F, Treister NS, Di Lenarda R, Biasotto M, Zacchigna S. Class IV laser therapy as treatment for chemotherapy-induced oral mucositis in onco-haematological paediatric patients: a prospective study. *Int J Paediatr Dent*. 2014 Nov;24(6):441-9. doi: 10.1111/ipd.12090. Epub 2013 Dec 25.
26. Crisan B, Soritau O, Baciut M, Campian R, Crisan L, Baciut G, Influence of three laser wavelengths on human fibroblasts cell culture, *Lasers Med Sci*. 28(2) (2013) 457-63
27. de Almeida P, Lopes-Martins RA, De Marchi T, Tomazoni SS, Albertini R, Corrêa JC, Rossi RP, Machado GP, da Silva DP, Bjordal JM, Leal Junior EC. Red (660 nm) and infrared (830 nm) low-level laser therapy in skeletal muscle fatigue in humans: what is better? *Lasers Med Sci*. 2012 Mar;27(2):453-8. doi: 10.1007/s10103-011-0957-3. Epub 2011 Jul 22.

28. de Morais NC, Barbosa AM, Vale ML, Villaverde AB, de Lima CJ, Cogo JC, Zamuner SR. Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomed Laser Surg.* 2010 Apr;28(2):227-32.
29. Deveci D., Marshall J.M., Egginton S. (2002). Muscle ischaemia in rats may be relieved by overload-induced angiogenesis. *Exp Physiol* 87, 479-488. Liu H. et al., 2008; Kovács, et al., 1974
30. Dini D, Del Mastro L, Gozza A (1998) The role of pneumatic compression in the treatment of postmastectomy lymphedema. A randomized phase III study. *Ann Oncol* 9:187–190
31. Dirican A, Andacoglu O, Johnson R, McGuire K, Mager L, Soran A, The short-term effects of low-level laser therapy in the management of breast-cancer-related lymphedema. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 19(5) (2010) 685–690.
32. Dogan MD, Ataoglu H, Ataoglu O, Akarsu ES. Polysaccharide mannan components of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats. *Brain Res Bull* 1999; 48:509-12.
33. Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB, Manzullo E, Rubenstein EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. *Cancer* Oct 1;2003 98(7):1531–1539.
34. Ferreira D.M., Zingaro R.A., Balbin Villaverde A., Cury Y., Frigo L., Piccolo G., Longo I., Barbosa D.G. Analgesic Effect of He-Ne (632.8 nm) Low-Level Laser Therapy on Acute Inflammatory Pain. *Photomedicine and Laser Surgery*. April 1, 2005, 23(2): 177-181. Doi:10.1089/pho.2005.23.177.
35. Frigo L, Fávero GM, Lima HJ, Maria DA, Bjordal JM, Joensen J, Iversen VV, Marcos RL, Parizzoto NA, Lopes-Martins RA, Low-level laser irradiation (InGaAlP-660 nm) increases fibroblast cell proliferation and reduces cell death in a dose-dependent manner, *Photomed Laser Surg.* 28 Suppl 1 (2010) S151-6
36. Frigo L, Luppi JS, Favero GM, Maria DA, Penna SC, Bjordal JM, Bensadoun RJ, Lopes-Martins RA. The effect of low-level laser irradiation (In-Ga-Al-AsP - 660 nm) on melanoma in vitro and in vivo. *BMC Cancer*. 2009 Nov 20;9:404.

37. Fu MR, Cleland CM, Guth AA, Qiu Z, Haber J, Cartwright-Alcares F, Kleinman R, Scagliola J, Axelrod D. The role of symptom report in detecting and diagnosing breast cancer-related lymphedema. *Euro J ClinMed Oncol.* 2013;1-9.
38. Fukuhara E, Goto T, Matayoshi T, Kobayashi S, T. Takahashi T, Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts, *Calcif Tissue Int.* 79(6) (2006) 443-50
39. Galanti G, Moretti A, Lo Nero L. Application of MLS laser on muscular contracture caused by functional overload in a young athlete - case report. *Energy for Health,* 2012, 9:12-14.
40. Galanti G, Stefani L, Iacchi A, Lonero L, Moretti A. The effects of MLS laser therapy in elite football players affected by muscles injuries: a controlled clinical trial. *Energy for Health* 2013, 10:4-8.
41. Gobbo M, Ottaviani G, Perinetti G, Ciriello F, Beorchia A, Giacca M, Di Lenarda R, Rupel K, Tirelli G, Zacchigna S, Biasotto M. Evaluation of nutritional status in head and neck radio-treated patients affected by oral mucositis: efficacy of class IV laser therapy. *Support Care Cancer.* 2014 Jul;22(7):1851-6. doi: 10.1007/s00520-014-2155-x. Epub 2014 Feb 20.
42. Golshan M, Smith B, "Prevention and management of arm lymphedema in the patient with breast cancer," *J Support Oncol.* 4(8),381-6 (2006).
43. Gomes Henriques AC, Ginani F, Oliveira RM, Keesen TS, Galvão Barboza CA, Oliveira Rocha HA, de Castro JF, Della Coletta R, de Almeida Freitas R, Low-level laser therapy promotes proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells, *Lasers Med Sci.* 29(4) (2014) 1385-95
44. Güngörmüş M, Akyol U. The effect of gallium-aluminum-arsenide 808-nm low-level laser therapy on healing of skin incisions made using a diode laser. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):895-9. doi: 10.1089/pho.2008.2431.
45. Gupta A, Keshri GK, Yadav A, Gola S, Chauhan S, Salhan AK, Bala Singh S. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics.* 2014 Sep 10;9999(9999). doi: 10.1002/jbio.201400058.

46. Guyton AC. The lymphatic system, interstitial fluid dynamics, edema, and pulmonary fluid. In: Guyton AC.: Textbook of Medical Physiology. Philadelphia: WB Saunders, 7th ed., 1986, pp 361-373.
47. Hagiwara S, Iwasaka H, Okuda K, Noguchi T. GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Lasers Surg Med.* 2007 Dec;39(10):797-802.
48. Hardy WD, Zuckerman E, Corbishley J. Serological evidence that Bartonella cause gingivitis and stomatitis in cats. In Proceedings, 16th Annual Veterinary Dental Forum, October 3–6, 2002, 79–82.
49. Hawkins D, Abrahamse H. Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2008 Aug;24(4):199-210. doi: 10.1111/j.1600-0781.2008.00362.x
50. Hawkins DH, Abrahamse H, Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy, *J Photochem Photobiol B.* 88(2-3) (2007) 147-55
51. Hayes SC, Janda M, Cornish B, Battistutta D, Newman B (2008) Lymphedema after breast cancer: incidence, risk factors, and effect on upper body function. *J Clin Oncol* 26:3536–3542
52. Hegedus B, Viharos L, Gervain M, Gálfi M. The effect of low-level laser in knee osteoarthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2009 Aug;27(4):577-84. doi: 10.1089/pho.2008.2297.
53. Huang CY, Lin CY, Tsai CW, Yin MC, “Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by ursolic acid in human lung cancer cell lines,” *Toxicol In Vitro.* 25(7),1274-80 (2011).
54. Huang L, Wu S, Xing D, High fluence low-power laser irradiation induces apoptosis via inactivation of Akt/GSK3beta signaling pathway, *J Cell Physiol.* 226(3) (2011) 588–601.
55. Hudlicka O., Brown M., Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 1992 Apr;72(2):369-417.
56. International Society of Lymphology. The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema. Consensus document of the International Society of Lymphology. *Lymphology.* 2003 Jun;36(2):84-91.

57. Jaguar GC, Prado JD, Nishimoto IN, Pinheiro MC, de Castro DO Jr, da Cruz Perez DE, Alves FA. Low-energy laser therapy for prevention of oral mucositis in hematopoietic stem cell transplantation. *Oral Dis.* 2007 Nov;13(6):538-43.
58. Jang H, Lee H. Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas. *Photomed Laser Surg.* 2012 Aug;30(8):405-17. doi: 10.1089/pho.2012.3240. Epub 2012 Jun 29.
59. Jimbo K., Noda K., Suzuki K., Yoda K. Suppressive effects of low-power laser irradiation on bradykinin evoked action potentials in cultured murine dorsal root ganglion cells. *Neurosci Lett* 1998 Jan 9;240(2):93-6.
60. Kandolf-Sekulovic L., Kataranovski M., Pavlovic M.D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction. (2003). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 19, 203-212.
61. Karu T.I., (1991). Low intensity laser light action upon fibroblasts and lymphocytes. In: Ohshiro T., Calderhead R:G., (eds). *Progress in laser therapy. Selected papers from the October 1990 ILTA congress.* Wiley, West Sussex, England, pp 175-179.
62. Kaviani A, Fateh M, Yousefi Nooraie R, Alinagi-Zadeh MR, Ataie-Fashtami L. Low-level laser therapy in management of postmastectomy lymphedema. *Laser in Medical Science*, 21(2) (2006) 90-94.
63. Kawiak J., Brzóška E., Grabowska I., Hoser G., Stremińska W., Wasilewska D., Machaj E.K., Pojda Z., Moraczewski J. Contribution of stem cells to skeletal muscle regeneration. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(2):75-9.
64. Khoshvaghti A, Zibamanzarmofrad M, Bayat M. Effect of low-level treatment with an 80-Hz pulsed infrared diode laser on mast-cell numbers and degranulation in a rat model of third-degree burn. *Photomed Laser Surg.* 2011 Sep;29(9):597-604. doi: 10.1089/pho.2010.2783. Epub 2011 Apr 1.
65. Kozanoglu E, Basaran S, Paydas S, Sarpel T, Efficacy of pneumatic compression and low-level laser therapy in the treatment of postmastectomy lymphoedema: a randomized controlled trial, *Clin Rehabil.* 23(2) (2009)117-24
66. Kramer EL. Lymphoscintigraphy: defining a clinical role. *Lymphat Res Biol.* 2004;2(1):32-7.

67. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershhausen B, d'Hoedt B, Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts, *Lasers Surg Med.* 30(5) (2002) 365-9
68. Kujawa J., Zavodnik L., Zavodnik I., Buko V., Lapshyna A., Bryszewska M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure. *J Clin Laser Med Surg.* 2004 Apr;22(2):111-7.
69. Lau RW, Cheing GL, Managing postmastectomy lymphedema with low-level laser therapy, *Photomed Laser Surg.* 27(5) (2009) 763-9
70. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Baroni BM, De Marchi T, Taufer D, Manfro DS, Rech M, Danna V, Grosselli D, Generosi RA, Marcos RL, Ramos L, Bjordal JM. Effect of 830 nm low-level laser therapy applied before high-intensity exercises on skeletal muscle recovery in athletes. *Lasers Med Sci.* 2009b Nov;24(6):857-63. doi: 10.1007/s10103-008-0633-4. Epub 2008 Dec 5.
71. Leal Junior EC, Lopes-Martins RA, Vanin AA, Baroni BM, Grosselli D, De Marchi T, Iversen VV, Bjordal JM. Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. *Lasers Med Sci.* 2009a May;24(3):425-31. doi: 10.1007/s10103-008-0592-9. Epub 2008 Jul 23.
72. Lee T, Kilbreath S, Refshauge K, Herbert R, Beith J (2008) Prognosis of the upper limb following surgery and radiation for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 110:19–37
73. Lino MD, Carvalho FB, Oliveira LR, Magalhães EB, Pinheiro AL, Ramalho LM. Laser phototherapy as a treatment for radiotherapy-induced oral mucositis. *Braz Dent J.* 2011;22(2):162-5
74. Lommer MJ, Verstraete FJM. Concurrent oral shedding of feline calicivirus and feline herpesvirus 1 in cats with chronic gingivostomatitis. *Oral Microbiology and Immunology* 18:131–134, 2003
75. Lyon KF. Gingivostomatitis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 35(4):891–911, 2005.
76. Maiya AG, Sagar MS, Fernandes D. Effect of low level helium-neon (He-Ne) laser therapy in the prevention and treatment of radiation induced mucositis in head and neck cancer patients. *Indian J Med Res.* 2006;124:399–40

77. 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(3):260-5.
78. McWayne J, Heiney SP, “Psychologic and social sequelae of secondary lymphedema: a review,” *Cancer.* 104(3),457-66 (2005).
79. Mille C, Bobrowicz P, Trinel PA, et al. Identification of a new family of genes involved in beta-1,2-mannosylation of glycans in *Pichia pastoris* and *Candida albicans*. *J Biol Chem* 2008; 283:9724-36.
80. Mochizuki-Oda N., Kataoka Y., Cui Y., Yamada H., Heya M., Awazu K. Effects of near-infrared laser on adenosine triphosphate and adenosine diphosphate contents of rat brain tissue. *Neurosci Lett.* 2002 May 3;323(3):207-10.
81. Monici M, Cialdai F (2012). The role of physical factors in cells differentiation, tissue repair and regeneration. In: (a cura di): Yip G. , *Tissue Regeneration: From Basic Biology to Clinical Application.* p. 13-34, RIJEKA (CROATIA):InTech - Open Access Publisher, ISBN: 978-953-307-876-2
82. Monici M, Cialdai F, Ranaldi F, Paoli P, Boscaro F, Moneti G, Caselli A. Effect of IR laser on myoblasts: a proteomic study. *Mol Biosyst.* 2013 Jun;9(6):1147-61. doi: 10.1039/c2mb25398d.
83. Moore P., Ridgway T.D., Higbee R.G., Howard E.W., Lucroy M.D. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Laser Surg Med.* 2005 Jan;36(1):8-12.
84. Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, Baba T, Yao G, Kim JW, Gatz M, Murphy S, Nevins JR, Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential, *Oncogene.* 28(31) (2009) 2796-805
85. Nakano J., Kataoka H., Sakamoto J., Origuchi T., Okita M., Yoshimura T. (2009). Low-level laser irradiation promotes the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle in rats. *Exp Physiol* 94.9 pp 1005-1015.
86. Navratil L., Skopek J., Hornkova J., Kyplova J., Knizek J. Comparison of the analgesic effect of ultrasound and low-level laser therapy in patient suffering from plantar fasciitis (calcar calcanei) *Proc. SPIE Vol.4606,* p. 114-121, 2001.

87. Netea MG, Maródi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol.* 2010 Sep;31(9):346-53. doi: 10.1016/j.it.2010.06.007. Epub 2010 Aug 11.
88. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem Photobiol Sci.* 1(1) (2002) 1-21
89. Oron U., Ilic S., De Taboada L., Streeter J. Ga-As (808 nm) laser irradiation enhances ATP production in human neuronal cells in culture. *Photomed Laser Surg.* 2007 Jun;25(3):180-2.
90. Passerella S., Casamassima E., Molinari S., Pastore D., Quagliariello E., Catalano I.M., Cingolani A. (1984). Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett* 175, 95-99.
91. 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.* 31(4) (2002) 263-7
92. Piller NB, Thelander A, Treating chronic postmastectomy lymphoedema with low level laser therapy: a cost effective strategy to reduce severity and improve the quality of survival. *Laser Therapy* 7 (1995) 163–8
93. Piller NB, Thelander A, Treatment of chronic postmastectomy lymphoedema with low level laser therapy: A 2.5 year follow-up. *Lymphology* 31 (1998) 74–86
94. Pinheiro AL, Carneiro NS, Vieira AL, Brugnera A Jr, Zanin FA, Barros RA, Silva PS, “Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study,” *J Clin Laser Med Surg.* 20(1), 23-6 (2002).
95. Powell K, Low P, McDonnell PA, Laakso EL, Ralph SJ. The effect of laser irradiation on proliferation of human breast carcinoma, melanoma, and immortalized mammary epithelial cells. *Photomed Laser Surg.* 2010 Feb;28(1):115-23.
96. Prado RP, Liebano RE, Hochman B, Pinfildi CE, Ferreira LM. Experimental model for low level laser therapy on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 2006, Vol 21 (4) 268-262.

97. Radwan DA, Mohammed NH, Zaky AA. Effectiveness of Low Power Laser Therapy and Betamethasone in Minimizing Postoperative Edema and Trismus after Third Molar Surgery: a Clinical Trial. *Journal of American Science*, 2010;6(12).
98. Rizzi CF, Mauriz JL, Freitas Corrêa DS, Moreira AJ, Zettler CG, Filippin LI, Marroni NP, González-Gallego J. Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med*. 2006 Aug;38(7):704-13.
99. Rodrick JR, Poage E, Wanchai A, Stewart BR, Cormier JN, Armer JM. Complementary, alternative, and other noncomplete decongestive therapy treatment methods in the management of lymphedema: a systematic search and review. *PM R*. 2014 Mar;6(3):250-74; quiz 274. doi: 10.1016/j.pmrj.2013.09.008. Epub 2013 Sep 18.
100. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011 Apr;11(4):275-88. Epub 2011 Mar 11.
101. Rossi F, Pini R, Monici M (2010). Direct and indirect photomechanical effects in cells and tissues. Perspectives of application in biotechnology and medicine. In: (a cura di): Monici M and van Loon J, *Cell Mechanochemistry. Biological systems and factors inducing mechanical stress, such as light, pressure and gravity*. p. 285-301, Trivandrum:Research Signpost / Transworld Research Network, ISBN: 9788178954585
102. Schartinger VH, Galvan O, Riechelmann H, Dudás J, Differential responses of fibroblasts, non- neoplastic epithelial cells, and oral carcinoma cells to low-level laser therapy, *Support Care Cancer*. 20(3) (2012) 523-9
103. Servetto N, Cremonezzi D, Simes JC, Moya M, Soriano F, Palma JA, Campana VR. Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers Surg Med*. 2010 Aug;42(6):577-83. doi: 10.1002/lsm.20910.
104. Shefer G, Barash I, Oron U, Halevy O, Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts, *Biochim Biophys Acta*, 1593(2-3) (2003)131-9

105. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 May 13. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x. [Epub ahead of print]
106. Silveira PC, Silva LA, Fraga DB, Freitas TP, Streck EL, Pinho R. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in muscle healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2009 May 4;95(2):89-92. Epub 2009 Jan 21.
107. Silveira PC, Streck EL, Pinho RA. Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2007 Mar 1;86(3):279-82. Epub 2006 Nov 20.
108. Sobrero AF, Bertino JR, Sequence-dependent synergism between dichloromethotrexate and cisplatin in a human colon carcinoma cell line, *Cancer Treat Rep.* 69(3) (1985) 279-83.
109. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury: Pathogenesis, Measurement, Epidemiology, and Consequences for Patients. *Cancer* 2004;100(S9):1995–2025.
110. Sperandio FF, Giudice FS, Corrêa L, Pinto DS Jr, Hamblin MR, de Sousa SC, Low-level laser therapy can produce increased aggressiveness of dysplastic and oral cancer cell lines by modulation of Akt/mTOR signaling pathway. *J Biophotonics.* Apr 2. (2013) doi: 10.1002/jbio.201300015
111. Sroka R, Schaffer M, Fuchs C, Pongratz T, Schrader-Reichard U, Busch M, Schaffer PM, Dühmke E, Baumgartner R, Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths, *Lasers Surg Med.* 25(3) (1999) 263-71
112. Sundaram PS, Subramanyam P. Lymphoscintigraphy in the evaluation of limb edema. *Clin Nucl Med.* 2013 Nov;38(11):891-903. doi: 10.1097/RLU.0b013e3182a758f9.
113. Svensson P., Bjerring P., Arendt-Nielsen L., Nielsen J.C., Kaaber S. Comparison of four laser types for experimental pain stimulation on oral mucosa and hairy skin. *Laser Surg Med.* 1991;11(4):313-24.

114. Szuba A, Cooke JP, Yousuf S, Rockson SG (2000) Decongestive lymphatic therapy for patients with cancer-related or primary lymphedema. *Am J Med* 109:296–300
115. Taniguchi D, Dai P, Hojo T, Yamaoka Y, Kubo T, Takamatsu T, Low-energy laser irradiation promotes synovial fibroblast proliferation by modulating p15 subcellular localization, *Lasers Surg Med.* 41(3) (2009) 232-9
116. Thomsen S. Pathologic analysis of photothermal and photomechanical effects of laser-tissue interactions. *Photochem Photobiol.* 1991 Jun;53(6):825-35.
117. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007 Apr;39(4):373-8.
118. Ueno K, Okawara A, Yamagoe S, et al. The mannan of *Candida albicans* lacking beta-1,2-linked oligomannosides increases the production of inflammatory cytokines by dendritic cells. *Med Mycol* 2013; 51:385-95.
119. Vignali L, Cialdai F, Monici M. Effect of MLS laser on myoblasts cell line C2C12. *Energy for Health* 2011, 7:12-18.
120. Vinck EM, Cagnie BJ, Cornelissen MJ, Declercq HA, Cambier DC, Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation, *Lasers Med Sci.* 18(2) (2003) 95-9
121. Vladimirov Y.A., Osipov A.N., Klebanov G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. (2004). Review. *Biochemistry* 69,81-90.
122. Wang F, Chen TS, Xing D, Wang JJ, Wu YX, Measuring dynamics of caspase-3 activity in living cells using FRET technique during apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation, *Lasers Surg Med.* 36(1) (2005) 2-7
123. Weiss N., Oron U. (1992). Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat Embryol (Berl)* 186,497-503.
124. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):250-65. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x.

125. Wu S, Xing D, Gao X, Chen WR, High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species, *J Cell Physiol.* 218(3) (2009) 603-11
126. Wu S, Zhou F, Wei Y, Chen WR, Chen Q, Xing D, Cancer phototherapy via selective photoinactivation of respiratory chain oxidase to trigger a fatal superoxide anion burst, *Antioxid Redox Signal.* 20(5) (2014) 733-46
127. Yoo J, Lacchetti C, Hammond JA, Gilbert RW, Head and Neck Cancer Disease Site Group, Role of endolaryngeal surgery (with or without laser) versus radiotherapy in the management of early (T1) glottic cancer: A systematic review, *Head Neck.* Sep 30 (2013)
128. Zhang R, Mio Y, Pratt PF, Lohr N, Warltier DC, Whelan HT, Zhu D, Jacobs ER, Medhora M, Bienengraeber M, Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism, *J Mol Cell Cardiol.* 46(1) (2009) 4-14

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio vivamente la Prof. Maria Gabriella Torcia, la Dr.ssa Annamaria Clemente, la Dr.ssa Lisa Rizzetto ed il Prof. Duccio Cavalieri per la collaborazione e la realizzazione degli esperimenti dello studio sull'applicazione della laserterapia nel trattamento della mucositi orali ed il Prof. Enrico Mini, la Dr.ssa Ida Landini, la Dr.ssa Stefania Nobili ed il Dr. Matteo Lulli per la collaborazione e la realizzazione degli esperimenti dello studio sull'applicazione della laserterapia nel trattamento della linfedema post mastectomia.

Un grazie al Prof. Franco Fusi e al Dr. Giovanni Romano per la loro generosa disponibilità e le preziose competenze fisiche e tecniche.

Grazie a Leonardo, Alessio, Elettra, Paola e Pasquale per il sostegno e l'aiuto che ogni giorno mi hanno dimostrato.

Al tutor del mio dottorato, il Prof. Sergio Capaccioli, va la mia gratitudine per avermi permesso di realizzare questo progetto e per i preziosi suggerimenti fornitomi in queste tre anni.

Un ringraziamento particolare va alla Dr.ssa Monica Monici, insostituibile punto di riferimento scientifico e umano.

Infine, ma non per ultimo, un grazie ad ASA srl (Vicenza, Italia) per aver permesso lo svolgimento di questo progetto di dottorato mettendo a disposizione l'apparecchiatura laser utilizzata nelle ricerche.