



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA  
CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA  
BIOMEDICA

Tesi di Laurea Triennale (D.M. 509/99)

**Studio degli effetti di campi  
elettromagnetici ad alta frequenza su  
cellule di glioma umano e su modelli  
murini affetti dalla sindrome di Alzheimer**

**Relatore**

Prof. Alfredo Ruggeri

**Laureando**

Francesca Bunicci

**Correlatori**

Prof. Stefano Vassanelli  
Dott. Stefano Girardi

Anno Accademico 2011/2012



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>5</b>
1.1	Le cellule gliali . . . . .	5
1.2	I gliomi . . . . .	6
1.3	La malattia di Alzheimer . . . . .	9
1.4	Campi elettromagnetici e cellule . . . . .	14
1.5	Risonanza quantica molecolare . . . . .	16
1.5.1	Vesalius . . . . .	16
1.5.2	Rexon-Age . . . . .	17
1.6	Precedenti sperimentazioni . . . . .	18
<b>2</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>19</b>
2.1	Tipi di sperimentazione e obiettivi . . . . .	19
2.2	Modelli murini . . . . .	19
2.3	Cellule H4 . . . . .	20
2.4	Stimolazioni con Rexon-Age . . . . .	20
2.5	Test svolti . . . . .	21
2.5.1	Test su topi APPPS1 . . . . .	21
2.5.2	Test su cellule H4 . . . . .	22
2.5.3	Stimolazione a 40 a lungo periodo . . . . .	23
2.5.4	Stimolazione a 50 . . . . .	24
<b>3</b>	<b>Risultati</b>	<b>25</b>
3.1	Elaborazione dati . . . . .	25
3.1.1	Test su topi APPPS1 . . . . .	25
3.1.2	Test su cellule H4 . . . . .	28
3.1.3	Stimolazione a 40 a lungo periodo . . . . .	30
3.1.4	Stimolazione a 50 . . . . .	31
<b>4</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>33</b>
4.1	Topi APPPS1 . . . . .	33
4.2	Prospettive future . . . . .	33
4.3	Cellule H4 . . . . .	34



# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Le cellule gliali

Il sistema nervoso centrale è formato da due tipi principali di cellule: i neuroni e le cellule gliali. I neuroni sono elementi in grado di ricevere e trasmettere uno stimolo elettrico. Le cellule gliali (o neuroglia) formano per il 40% le cellule del nostro sistema nervoso centrale e sono elementi che non conducono l'impulso nervoso ma aiutano i neuroni nel loro compito, svolgendo un'azione trofica e di protezione. Esse possono rigenerare e quindi partecipare alla formazione di cicatrici dopo lesioni del sistema nervoso centrale. Si distinguono numerosi tipi di cellule gliali:

- Gli astrociti sono elementi stellati che formano l'impalcatura di sostegno del tessuto. A seconda della quantità di filamenti nel citoplasma, si distinguono astrociti fibrosi e protoplasmatici. Gli astrociti avvolgono inoltre i vasi sanguigni contribuendo a formare la barriera ematoencefalica.
- Gli olodentrociti sono cellule gliali che formano la guaina mielinica attorno agli assoni all'interno del sistema nervoso centrale. Nel sistema nervoso periferico non ci sono invece oligodentrociti e la guaina mielinica è formata dalle cellule di Schwann.
- La microglia è costituita da piccole cellule di difesa in grado di fagocitare sostanze estranee.
- Le cellule dell'ependima formano uno strato che riveste le cavità ventricolari ed il canale dell'ependima.
- Le cellule di Schwann formano le guaine mieliniche nel sistema nervoso periferico, avvolgendo progressivamente l'assone. La mielina è costituita da strati successivi della membrana citoplasmatica delle cellule di Schwann. La composizione della mielina è essenzialmente quella delle

membrane cellulari essendo predominanti i fosfolipidi, ed in particolare la fosfatidilcolina e la fosfadiletanolamina.

## 1.2 I gliomi

Con il termine glioma si indicano quei tumori che derivano dalle cellule della glia formanti il tessuto di sostegno cerebrale. Ci sono due grosse categorie di tumori che si sviluppano nel SNC:

- i tumori intracerebrali, più spesso maligni, raramente operabili.
- I tumori extracerebrali, più spesso benigni, operabili.

Si possono distinguere innanzitutto i tumori *primari*, che originano nel parenchima encefalico e nei suoi involucri, e i tumori *metastatici*, ovvero metastasi dovute a neoplasie localizzate in altri organi oppure recidive di primari.

Si classificano i tumori in base al grado di malignità, la scala di *grading* introdotta nel 1993 dalla OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) che può andare da I a IV. Per stabilire il grado di malignità, i medici effettuano un'analisi della massa neoplastica osservando:

- similarità con le cellule normali (atipia)
- tasso di crescita (indice mitotico)
- tasso di crescita e morte di cellule tumorali al centro del focolaio neoplastico (necrosi)
- tasso di diffusione potenziale, valutato in base ai margini del tumore (diffuso o focale)
- flusso ematico (vascolarità)

I tumori maligni primari sono i più frequenti e si suddividono in:

### 1. Tumori Astrocitari

- Gli Astrocitomi

Si suddividono in astrocitomi di basso grado e di alto grado di malignità.

Gli astrocitomi di basso grado sono neoplasie poco comuni, a istologia benigna e guaribili con la sola chirurgia.

Sono neoplasie circoscritte e localizzate con ridotta capacità invasiva, limitata capacità di crescita e scarsa propensione alla trasformazione maligna. Essi comprendono l'astrocitoma pilocitico

(con la variante pilomixoide), l'astrocitoma subependimale a cellule giganti e lo xantoastrocitoma pleomorfo. Insorgono per lo più in età pediatrica o nella seconda decade di vita del paziente.

Gli astrocitomi di alto grado sono tumori infiltranti con proliferazione cellulare più monomorfe senza mostruosità cellulari. Questi tumori si riscontrano a una età media tra i 40 – 50 anni. La capacità infiltrativa del tumore pregiudica l'efficacia dei trattamenti di radioterapia e dell'asportazione chirurgica in quanto risulta difficile individuare un'esatta area da trattare senza compromettere il tessuto sano circostante. Un astrocitoma ben differenziato può permettere una sopravvivenza di molti anni anche se molto spesso vira in forme molto maligne.

Infine c'è l'astrocitoma anaplastico.

La forma anaplastica si caratterizza per cellularità aumentata, spiccato pleomorfismo nucleare, ipercromatismo nucleare più evidente e presenza di mitosi. La progressione da astrocitoma ad astrocitoma anaplastico si osserva in circa il 50-75% delle recidive tumorali.

- I Glioblastomi

Sono i più frequenti tra i tumori gliali: sono rapidamente evolutivi, infiltranti senza limiti netti, destruenti, spesso necrotizzanti; si associano a un imponente edema cerebrale e il tumore è riccamente vascolarizzato. Il glioblastoma multiforme rappresenta la più grave delle neoplasie astrocitarie diffuse e la più comune. Solitamente sono tumori secondari in quanto originano dall'insorgenza di tumori astrocitari di grado inferiore.

I tipi cellulari che compongono il glioblastoma multiforme sono il glioblastoma a cellule giganti e il gliosarcoma.

Si può vedere:

- proliferazione cellulare polimorfa con mostruosità cellulari che sono mitoticamente inattive, sia piccole cellule anaplastiche responsabili della crescita e della diffusione della lesione;
- sede soprattutto emisferica;
- evoluzione rapida con ipertensione endocranica precoce;
- abbondante neovascolarizzazione e corto circuiti artero venosi all'arteriografia;
- più frequente nell'uomo verso i 50 anni;
- trattamento radioterapico basato su campi elettrici non ionizzanti, per indurre la morte cellulare delle formazioni neoplastiche.

– sopravvivenza da 6 mesi a due anni.

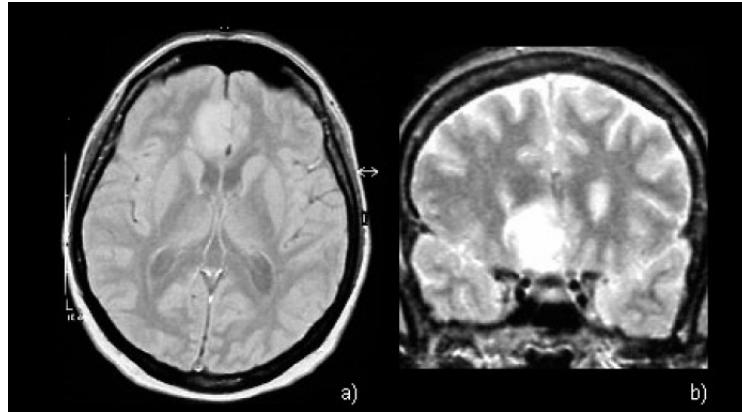


Figura 1.1: RM di astrocitoma fibrillare frontale destro in sezione assiale a) e laterale b)

## 2. Oligodendrogliomi

Gli oligodendrogliomi rappresentano circa il 10-15% di tutti i gliomi e sono particolarmente importanti per l'unicità nella sensibilità alla chemioterapia. Si classificano in oligodendrogliomi di basso grado (i più frequenti) o anaplastici. È un tipo di glioma raro, che si sviluppa alle spese delle cellule oligogliali, la cui evoluzione è lenta. Spesso è caratterizzato da calcificazioni con distribuzione curvilinea che corrisponde alle circonvoluzioni cerebrali. I sintomi evidenziano crisi epilettiche, deficit neurologici focali, modifiche della personalità e pressione endocranica elevata dovuta alla compromissione che provoca cefalea, vomito, ecc.. L'oligodendroglioma anaplastico è caratterizzato da alta cellularità, polimorfismo nucleare, mitosi frequenti, abbondante proliferazione endoteliale e necrosi.

## 3. Ependimomi

Questi tumori si sviluppano dalle cellule ependimali che rivestono le cavità ventricolari e il canale midollare. Possono colpire ogni età ma rappresentano il 10% di tutte le neoplasie cerebrali dell'infanzia e dell'adolescenza.

Di questi tumori vi sono numerose varianti: ependimoma cellulare, papillare, a cellule chiare e mixopapillare. Gli ependimomi classici sono di basso grado, caratterizzati da lenta crescita e calcificazioni, comuni a tutte le forme. Gli ependimomi anaplastici sono maligni e posseggono alto numero di mitosi, marcata iperplasia endoteliale e ampie aree di necrosi.



Figura 1.2: RM/T2 di paziente affetto da oligodendroglioma

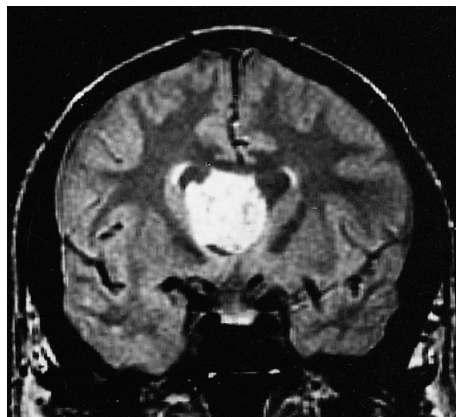


Figura 1.3: RM di subependimoma

### 1.3 La malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer è la causa più comune di demenza nella popolazione anziana dei paesi occidentali, rappresentando il 50-60% dei casi di deterioramento mentale a esordio tardivo. Patologia degenerativa del sistema nervoso centrale che porta al decesso in circa 10 anni l'Alzheimer Disease (AD) ha un decorso caratterizzato da un prevalente e iniziale deficit di memoria episodica seguito dal progressivo, sequenziale impoverimento delle funzioni attentive ed esecutive, della memoria semantica, del linguaggio, dell'orientamento, delle abilità visuo-spaziali e della prassia. La graduale riduzione delle capacità cognitive interferisce con il normale svolgimento delle attività lavorative e sociali e può associarsi ad alterazioni comportamentali. In una fase successiva si perdono le abilità di lettura, scrittura e denominazione e si

determina una progressiva, gerarchica compromissione della capacità di eseguire attività anche abituali della vita quotidiana, con una precoce difficoltà nell'esecuzione delle più complesse e una relativa conservazione di quelle di base. I risultati di studi trasversali condotti su pazienti a vari livelli di gravità hanno consentito di formulare l'ipotesi di una progressione per stadi caratterizzati da specifici *cluster* di sintomi e segni cognitivi e funzionali.

### **Progressione Gerarchica della sintomatologia nell'Alzheimer Disease**

Il decorso della malattia può essere diverso, nei tempi e nelle modalità sintomatologiche, per ogni singolo paziente; esistono comunque una serie di sintomi comuni, che si trovano frequentemente associati nelle varie fasi con cui, clinicamente, si suddivide per convenzione il decorso della malattia. Ad una prima fase lieve, fa seguito la fase intermedia, e quindi la fase avanzata/severa; il tempo di permanenza in ciascuna di queste fasi è variabile da soggetto a soggetto, e può in certi casi durare anche diversi anni.

#### *FASE INIZIALE*

- Minimo disorientamento temporale con difficoltà nel ricordare eventi recenti
- Difficoltà a trovare le parole con relativa conservazione della capacità di comprensione
- Ansia, depressione e negazione di malattia
- Difficoltà sul lavoro e assenza di alterazioni motorie

#### *FASE INTERMEDIA*

- Disorientamento spazio temporale e deficit di memoria di entità moderato-grave
- Chiaro disturbo del linguaggio
- Aprassia costruttiva, ideativa e ideo-motoria e dell'abbigliamento
- Alterazioni comportamentali (deliri, allucinazioni, wandering)

#### *STADI TERMINALI*

- Completa perdita delle abilità cognitive con difficoltà nel riconoscere volti o luoghi familiari
- Perdita del linguaggio fino a gergo semantico o mutismo

- Rigidità, bradicinesia, crisi epilettiche, aggressività
- Completa perdita dell'autosufficienza per lavarsi, vestirsi e alimentarsi

A livello neurologico *macroscopico*, la malattia è caratterizzata da una diminuzione nel peso e nel volume del cervello, dovuta ad atrofia corticale, visibile anche in un allargamento dei solchi e corrispondente appiattimento delle circonvoluzioni. A livello *microscopico* e cellulare, sono riscontrabili depauperamento neuronale, placche senili (dette anche placche amiloidi), ammassi neurofibrillari, angiopatia congofila (amiloidea). Una procedura diagnostica standard per la demenza e l'AD ha ribadito l'importanza dell'esecuzione di esami ematici, inclusi il dosaggio della vitamina B12 e la funzionalità tiroidea. Per la diagnosi precoce dell'Alzheimer ci sono i *marker biologici*, tra i quali quelli definiti 'modificatori genetici' come la apolipoproteina E (Apo E), l' $\alpha$ 1-antichimotripsina e l'HLA A2, e altri correlati alle modificazioni neuropatologiche della malattia: la Beta-amiloide e la proteina Tau.

Nei soggetti sani la Amyloid precursor protein (Proteina Progenitrice dell'Amiloide o APP) situata sulla membrana plasmatica, attraverso una reazione biologica catalizzata dall' $\alpha$ -secretasi prima e dalla  $\gamma$ -secretasi poi, produce un peptide innocuo chiamato p3. Per motivi non del tutto chiariti, nei soggetti malati l'enzima che interviene sull'APP non è l' $\alpha$ -secretasi ma una sua variante, la  $\beta$ -secretasi, che porta alla produzione insieme alla  $\gamma$ -secretasi di un peptide amiloidogenico  $A\beta$  di 40 ( $A\beta$ 1-40) e 42 ( $A\beta$ 1-42) aminoacidi: la beta-amiloide (fig. 1.4). Tale Beta-amiloide non presenta le caratteristiche biologiche della forma naturale, ma quando viene liberata fuori della cellula, si ammassa e si compatta con altre molecole e cellule non nervose creando le placche. Tali placche, dette placche senili, sono quindi formazioni extracellulari costituite da una parte centrale in cui si accumula proteina amiloide, e una parte periferica in cui si depositano detriti neuronali (principalmente frammenti assonali). Le placche neuronali innescano un processo infiammatorio che attiva una risposta immunitaria richiamando macrofagi e neutrofilo, i quali produrranno citochine, interleuchine e TNF-alfa che danneggiano irreversibilmente i neuroni.

Nei malati di Alzheimer interviene un ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni la proteina tau è iperfosforilata, e ciò ne causa l'appaiamento con altre unità di tau che finiscono poi per creare i grovigli neurofibrillari. Gli ammassi neurofibrillari sono fasci di filamenti elicoidali nel citoplasma dei neuroni che dislocano o avvolgono il nucleo. Tale contesto provoca un collasso della struttura microtubulare, con conseguenti problemi di comunicazione fra i neuroni e poi portandoli alla morte. In seguito al danno assonale, vi è concentrazione nel liquor di proteina tau fosforilata.

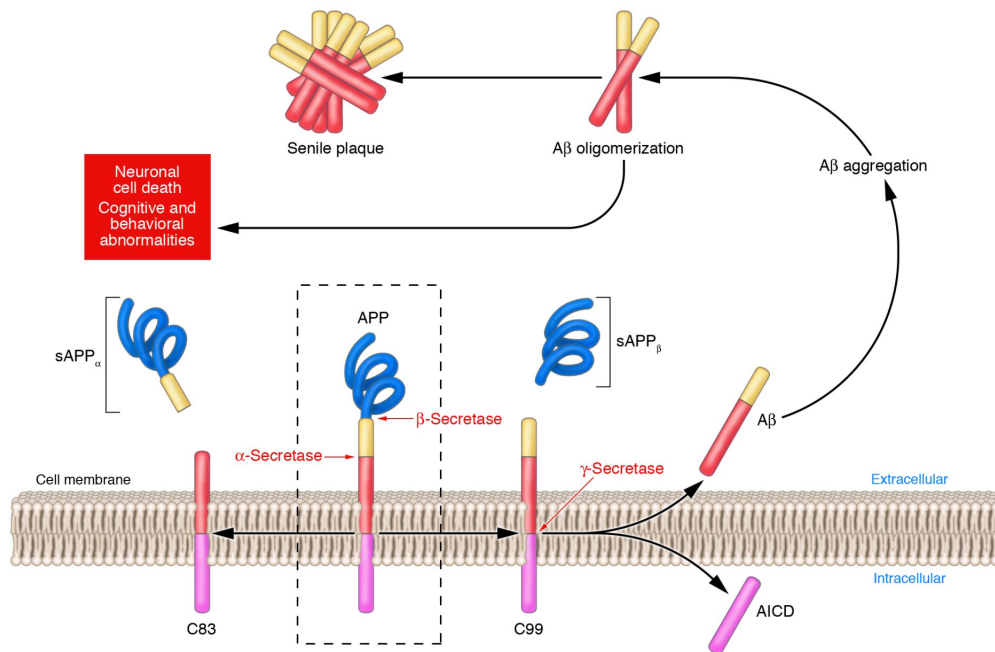


Figura 1.4: Processo di formazione della beta-amiloide

Il dosaggio liquorale della Beta-amiloide e della proteina tau è stato identificato come promettente candidato nella ricerca di marker biologici, in particolare dall'analisi post-mortem di tessuti cerebrali di pazienti affetti da Alzheimer si è potuto riscontrare un accumulo extracellulare della Beta-amiloide.

In pazienti con AD sono state rilevate basse concentrazioni liquorali di  $A\beta_{1-42}$  ed elevate concentrazioni di proteina tau, indipendentemente dalla gravità della malattia.

La disponibilità di metodiche immunoenzimatiche (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - ELISA) che impiegano anticorpi monoclonali specifici per l' $A\beta_{1-42}$  e in grado di rilevare proteine taufosforilate in siti diversi, ha consentito il raggiungimento di più alti livelli di accuratezza, in particolare quando si ricorra a misurazioni contemporanee di entrambi questi marker. Recentemente è stato suggerito che l'impiego del rapporto dei dosaggi di proteina tau fosforilata su treonina 181 (P-tau 181) e di  $A\beta_{1-42}$  possa avere un ruolo nella diagnosi tempestiva dell' AD. In via teorica i marker biologici potrebbero rappresentare un valido contributo nella diagnosi precoce nonché nel monitoraggio degli effetti di interventi terapeutici, specie se mirati a modificare la produzione della  $\beta$ -amiloide, ma la loro reale accuratezza necessita di ulteriori conferme.

### Neuropatologia dell'AD e diagnosi di certezza

La diagnosi di certezza dell'AD è tuttora vincolata all'esecuzione dell'esame istopatologico. Gli aspetti neuropatologici -placche senili(SP), ammassi neurofibrillari(NFT) e angiopatia amiloide- rappresentano tuttora gli elementi tipici necessari per consentirne la diagnosi definitiva. Gli NFT sono accumuli di neuriti distrofici contenenti filamenti a doppia elica la cui componente principale è la forma fosforilata della proteina tau, codificata dal cromosoma 17 e associata ai microtubuli.

Nell'AD la proteina risulta iperfosforilata e insolubile con ridotta affinità per i microtubuli e conseguente perdita di stabilità di questi ultimi. I depositi di  $\beta$ -amiloide si osservano sia all'interno della parete dei vasi cerebrali sia, più tipicamente, come placche senili o depositi extracellulari rappresentati da un nucleo centrale di fibrille di  $\beta$ -amiloide, circondati da un anello di neuriti distrofici, microglia e astrociti reattivi. Un ruolo cruciale rivestono la densità e la sede delle placche senili, la loro maggiore o minore specificità rispetto agli NFT e infine l'età al decesso, dal momento che sia la perdita neuronale sia le SP e gli NFT sono in qualche misura riscontrabili nell'invecchiamento normale e in altre patologie neurodegenerative.

Quindi non esiste un test specifico per determinare se una persona è affetta dalla malattia di Alzheimer. Si arriva alla diagnosi per esclusione, dopo un attento esame delle condizioni fisiche e mentali e non grazie al riconoscimento di prove tangibili specifiche della malattia:

- Anamnesi e visita medica
- Esami di laboratorio: sono stati sviluppati negli ultimi anni diversi strumenti per osservare l'encefalo, che permettono di fornire immagini del cervello in vivo, rivelando eventuali differenze tra il cervello delle persone sane e quello dei malati di Alzheimer.
- Esami strumentali:
  - Risonanza magnetica, che consente di ottenere un'immagine della struttura del cervello molto particolareggiata. Sovrapponendo un'immagine ad un'altra eseguita ad alcuni mesi di distanza, è possibile riscontrare i cambiamenti di una determinata parte del cervello.
  - TAC, misura lo spessore di una parte del cervello, che rapidamente si assottiglia nei pazienti affetti da Alzheimer.
  - SPECT, che viene eseguito per misurare il flusso del sangue nel cervello; si è riscontrato che tale flusso è ridotto nei malati di Alzheimer, per effetto di una diminuita attività delle cellule nervose.

- PET, tecnica limitata ai centri di ricerca che può evidenziare cambiamenti nel funzionamento del cervello del malato di Alzheimer come un utilizzo anormale del glucosio da parte del cervello.

## 1.4 Campi elettromagnetici e cellule

I sistemi biologici sono influenzati in modo piuttosto rilevante dalle interazioni bio-elettromagnetiche, in particolare anche piccoli campi magnetici hanno il potere di interagire con l'espressione di ormoni, proteine, anticorpi e neurotrasmettitori a livello della membrana cellulare e in processi anche più complessi come le capacità cognitive.

È quindi importante studiare l'interazione tra i campi elettromagnetici e i tessuti biologici per comprenderne i meccanismi e i possibili effetti biologici e sanitari.

Gli effetti esercitati dipendono principalmente da due fattori: l'intensità dei campi applicati (se elevata risulta distruttiva) e la loro frequenza.

Innanzitutto bisogna distinguere le radiazioni elettromagnetiche ionizzanti e radiazioni non ionizzanti.

Le prime hanno una frequenza molto alta (degli ultravioletti) e sono in grado di rompere un legame chimico, quindi se assorbite da una molecola questa viene spezzata. Le seconde invece non sono in grado di rompere direttamente i legami molecolari delle cellule perché i quanti che le costituiscono non possiedono energia sufficiente e sono generate da un campo elettromagnetico con frequenza compresa tra 0 e circa  $10^{15}$  Hz. Le radiazioni non ionizzanti si distinguono in base alla frequenza in:

- Frequenze estremamente basse (ELF – Extremely Low Frequency) con frequenza minore di 300 Hz
- Radiofrequenze (RF - Radio Frequency), comprese tra 300 KHz e 300 GHz

<b>Tipo di radiazione elettromagnetica</b>	<b>Frequenza</b>
Onde radio	$\leq 3$ GHz
Microonde	3 GHz - 300 GHz
Infrarossi	300 GHz - 428 THz
Luce visibile	428 THz - 749 THz
Ultravioletti	749 THz - 30 PHz
Raggi X	30 PHz - 300 EHz

Alla base dello studio dei campi elettromagnetici e la loro interazione con i sistemi biologici ci sono i cosiddetti effetti termici e non termici. Gli effetti termici sono dovuti alla dissipazione di energia elettromagnetica all'interno dei tessuti con conseguente aumento della temperatura. Questi effetti sono

ben noti da decenni e sono presenti per intensità di campo piuttosto elevate. Abbassando l'intensità l'effetto termico diventa trascurabile ed è in queste condizioni che si parla di possibili effetti non termici. Queste interazioni rivestono interesse nel campo biomedico in quanto gli eventuali utilizzi associati risultano poco invasivi per i tessuti. Sono quindi numerosi gli studi sperimentali in vitro volti ad analizzare gli effetti di campi elettromagnetici, a diverse frequenze, su vari parametri biologici.

Per quanto riguarda i campi variabili a basse frequenze (0-100 Hz), molti studi hanno riscontrato un'influenza sulla proliferazione cellulare. Piuttosto rilevante come gli effetti biologici dei campi elettromagnetici a bassa frequenza siano attualmente impiegati come terapia per la rigenerazione del tessuto osseo, con l'obiettivo di aumentare l'osteogenesi [6].

Parlando invece dei campi elettromagnetici ad alta frequenza gli studi svolti sono associati a microonde (tra i 30 e 300 GHz), frequenze utilizzate per la telefonia mobile (tra 300 MHz e 3 GHz) e frequenze in uso per applicazioni industriali.

È interessante osservare come risultati di test, che prevedevano di sottoporre a campi elettromagnetici cellule di mammifero, hanno evidenziato che a seconda del tipo di cellule e delle condizioni di esposizione, la proliferazione risultava incrementata o diminuita. In particolare nel caso della proliferazione diminuita sono state effettuate sperimentazioni su cellule di astrocitoma umano con un campo ad alte frequenze: la proliferazione risultava diminuita a seguito di un'interazione non esclusivamente termica [7]. Altri studi hanno rivelato un'inibizione della proliferazione di cellule tumorali sottoposte a campi elettrici alternati a medie frequenze. In particolare l'effetto inibitorio è stato riscontrato sul tasso di crescita di cellule tumorali sia umane che di roditori. Questi campi agiscono in due modi: arrestano la proliferazione cellulare e distruggono le cellule durante la fase di divisione meiotica.

Questi risultati dimostrano l'applicabilità potenziale dei campi elettromagnetici descritti come una modalità terapeutica per tumori maligni [8].

Un altro importante studio effettuato su topi dimostra che l'esposizione a lungo termine di campi elettromagnetici direttamente associata alle frequenze utilizzate per la telefonia mobile (918 MHz; 0.25 W/kg) sembra fornire benefici cognitivi. Questi effetti sono stati riscontrati sia per i topi normali che per topi transgenici destinati a sviluppare il morbo di Alzheimer [9].

Nasce quindi l'ipotesi di un futuro utilizzo di campi elettromagnetici a media ed alta frequenza a scopo terapeutico.

Si è approfonditamente studiato anche la relazione tra l'esposizione a questi campi e l'insorgenza di tumori, e sono poche le prove che indicano i campi elettromagnetici quali "iniziatori" del tumore. Continui studi vengono effettuati sui diversi campi magnetici ed è quindi un campo della ricerca ancora in evoluzione.

## 1.5 Risonanza quantica molecolare

La teoria della risonanza molecolare riguarda gli effetti dei campi elettrici variabili sulle molecole: i legami molecolari, sottoposti ad una certa frequenza, reagiscono scindendosi.

Assumendo che l'energia è racchiusa in quanti e che l'energia di ogni quanto dipende dalla frequenza, si è scoperto che esiste una frequenza alla quale energia quantica ed energia molecolare si equivalgono, in modo che le molecole entrano in risonanza, i legami si spezzano e i tessuti vengono incisi, ma senza aumento di calore. I campi utilizzati per la generazione dei quanti energetici devono quindi avere precise frequenze affinché abbia luogo il fenomeno della risonanza.

I dispositivi elettromedicali della Telea Electronic Engineering s.r.l. sfruttano questo fenomeno al fine di ottenere un trasferimento di energia senza che sia accompagnato da un aumento della temperatura. Per il trasporto dell'energia vengono utilizzate microcorrenti, di frequenza elevata e bassa intensità così che il tessuto non subisca danno termico.

Lo spettro di frequenze utilizzate varia da 4 a 64 Mhz, riproducendo uno spettro di frequenze specificatamente studiato e brevettato, basato appunto sulla Teoria della Risonanza Quantica Molecolare.

Il Rixon-age è un dispositivo medico di nuova concezione, che attraverso l'impiego di correnti a bassa potenza ed altissima frequenza, promuove una stimolazione dei tessuti cutanei e muscolari. Il cuore del sistema risiede nello specifico spettro di frequenze utilizzate. Questo si basa sul principio della Risonanza Quantica Molecolare, sviluppato e brevettato dalla Telea Electronic Engineering s.r.l. In particolare la Telea Electronic Engineering s.r.l. ha sviluppato il bisturi Vesalius e il Rixon-age, due applicazioni della stessa teoria della risonanza quantica molecolare, con lievi differenze che portano a utilizzi e risultati ben diversi.

### 1.5.1 Vesalius

Il Vesalius, è un bisturi elettronico a Risonanza Quantica Molecolare in grado di tagliare e coagulare ad una temperatura inferiore ai 45° C.

Grazie a ciò il danno termico degli interventi chirurgici, cioè la necrosi susseguente all'ustione, è scomparso. Il fatto interessante è che le molecole, sottoposte ad uno spettro di frequenze un po' più ampio e con una più

bassa densità di energia, non si rompono a causa del surriscaldamento ma entrando in risonanza si allontanano le une dalle altre, deformando la cellula e scindendo i legami molecolari.

Il vantaggio clinico è un'accelerazione dei processi rigenerativi e quindi una guarigione più veloce e meno dolorosa.

### 1.5.2 Rexion-Age

Il Rexion-Age rappresenta un'applicazione innovativa e diversa, rispetto al bisturi Vesalius, della Risonanza Quantica Molecolare, in quanto ha come scopo la rigenerazione tissutale. Infatti, attraverso l'utilizzo di correnti ad alte frequenze e piccole intensità, l'effetto di incisione ottenuto dal Vesalius è sostituito da una stimolazione che migliora la struttura e la funzionalità dei tessuti in particolare la pelle, i muscoli e i legamenti.

Il Rexion-Age utilizza uno spettro di frequenze tale da ridurre al minimo il trasferimento di energia termica, nella ricerca di quella risonanza con i legami molecolari che permette invece un'interazione a livello cellulare. Di fatto questa innovativa applicazione permette di mantenere la temperatura del tessuto relativamente bassa, tale che nei tessuti trattati non superi mai i 42-43° C.

Il Rexion-Age è infatti oggi utilizzato per terapie estetiche di ringiovanimento della pelle e per trattamenti antalgici con buoni risultati curativi del dolore dovuto a infiammazioni, strappi muscolari e dolori articolari. Si sono inoltre riscontrati significativi effetti nel trattamento di acne, cellulite e nella circolazione linfatica.

Dall'osservazione della sua azione rigenerativa a livello cellulare nasce quindi l'ipotesi che la stimolazione con risonanza molecolare sia applicabile anche nel trattamento dell'Alzheimer e di cellule tumorali.

Il modello dell'apparecchio reso disponibile dalla Telea Electronic Engineering s.r.l. per il presente progetto verrà utilizzato in due modi:

- per la stimolazione di modelli murini affetti dalla sindrome di Alzheimer mediante l'utilizzo di elettrodi
- per la stimolazione di cellule di glioma l'apparecchio è stato modificato per permettere la stimolazione di colture cellulari allestite in petri da 35 mm.

## 1.6 Precedenti sperimentazioni

Sono stati svolti alcuni test preliminari dell'applicazione del trattamento su cellule di astrocitoma umano, per verificare se le microcorrenti fossero dannose per le cellule. In particolare sono stati effettuati i test di mortalità e di temperatura.

Dal test di mortalità si è constatato che una stimolazione di 10 minuti fino ad una potenza di 70 (corrispondente alla potenza efficace di 17,88 W) non sia dannosa alla salute cellulare anche se da potenze superiori a 60 (11,74 W) si sia riscontrata una lieve modificazione morfologica.

I test sulla temperatura indicano che l'applicazione di potenze da 10 (potenza efficace pari a 0,04 W) a 80 (potenza efficace pari a 25,75 W) causa un incremento di temperatura trascurabile, in quanto abbondantemente inferiore all'escursione termica che le cellule subiscono nel passaggio da temperatura dell'incubatore (36,5 %) a temperatura ambiente. Da questa sperimentazione si è concluso che il trattamento non ha provocato significative variazioni nel tasso di crescita delle colture trattate e che stimolazioni in acuto con intensità pari a 3,47 W da 10 minuti ciascuno per 3 giorni non nuocciono alla salute cellulare. Comunque, i dati raccolti evidenziano una piccola diminuzione del valore di crescita nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate e questo ha portato a continuare la sperimentazione aumentando sia la durata di giorni, sia la potenza.

## Capitolo 2

# Materiali e metodi

### 2.1 Tipi di sperimentazione e obiettivi

Sono state svolte due diversi tipi di sperimentazione:

- su modelli murini affetti da Alzheimer
- su cellule di glioma umano

La prima sperimentazione mira a studiare gli effetti della tecnologia REXON-AGE sull'espressione e produzione della proteina beta-amiloide, maggior costituente delle placche senili e quindi responsabile di molte malattie neurodegenerative, nello specifico dell'Alzheimer. Si è ipotizzato che questa tecnologia potesse riscontrare degli effetti benefici in questo campo. Nello specifico la potenza utilizzata nella sperimentazione è stata di 40 (pari a potenza efficace di 3,47 W).

La seconda sperimentazione osserva le conseguenze del trattamento sulla proliferazione in vitro di cellule di glioma umano, considerandone il tasso di crescita al fine di valutarne la possibile applicazione per il trattamento di tumori cerebrali recidivi. Nello specifico è stato effettuato un altro ciclo di sperimentazioni alla potenza 40 (pari a potenza efficace di 3,47 W) e altri due cicli alla potenza 50 (pari a potenza efficace di 6,56 W), quindi superiore alle sperimentazioni precedenti.

### 2.2 Modelli murini

Per la sperimentazione sui modelli murini sono stati utilizzati topi transgenici in vivo C57BL/6J/APPPS1 ingegnerizzati per l'espressione di beta-amiloide e prodotti da Hertie Institut für klinische Hirnforschung. L'età dei topi all'inizio della sperimentazione era di circa 7 settimane e la durata della sperimentazione è stata di 6 settimane.

### 2.3 Cellule H4

Per la sperimentazione su cellule in vitro di glioma umano sono state utilizzate cellule H4, un particolare tipo di astrocitoma umano. Tali cellule hanno morfologia epiteliale e un ciclo replicativo di 48 ore e vengono mantenute in un incubatore a 37° C e atmosfera concentrata di  $CO_2$  al 5% (v/v).

Le cellule H4 sono state allestite in petri da 35 mm con un adeguato terreno di coltura costituito da:

- D-MEM (Dulbecco's Modied Eagle's Medium, addizionato di L-glutammina (Invitrogen-Gibco))
- FBS 10% (Foetal Bovine Serum, Invitrogen-Gibco)
- antibiotici (Penicillina 10u/ml, Streptomina 10 g/ml)

### 2.4 Stimolazioni con Raxon-Age

Per le stimolazioni è stata utilizzata l'apparecchiatura Raxon-Age sviluppata e brevettata dalla Telea Eletronic Engeneering s.r.l..

#### Caratteristiche tecniche

Tensione d'alimentazione	230 V
Frequenza d'alimentazione	50/60 Hz
Potenza massima assorbita dalla rete	250VA
Potenza massima in uscita	40W/1500 Ohm
Frequenza in uscita	spettro in frequenze da 4 MHz a 64 MHz (spettro brevettato)
Grado di protezione contro ingresso di liquidi	IPX0

Il dispositivo per la stimolazione dei topi viene utilizzato tramite due elettrodi esterni che vengono appoggiati sulla cute che ricopre il cranio, in modo che la stimolazione avvenga il più vicino possibile alla zona cerebrale. Per favorire una stimolazione più efficace viene spalmato nella zona dove poggiano gli elettrodi e sugli elettrodi stessi un gel conduttivo. I due elettrodi vengono posizionati e mantenuti in sede mediante due manipolatori meccanici.

Per la stimolazione delle cellule di glioma umano invece, il dispositivo utilizza differenti elettrodi adattati alla stimolazione in petri. Infatti, al posto dei due elettrodi l'apparecchiatura Raxon-Age dispone di un unico canale di uscita al quale è collegato un elettrodo di trasmissione metallico che verrà poi immerso direttamente nel terreno di coltura durante la stimolazione.

Pur utilizzando frequenze elevatissime il nuovo apparecchio dispone di una piastra neutra che viene posizionata sotto la petri e quindi permette di chiudere il circuito in qualsiasi evenienza.

## 2.5 Test svolti

### 2.5.1 Test su topi APPPS1

Topi di circa un mese e mezzo di vita sono stati sottoposti a stimolazione tramite gli appositi elettrodi due volte a settimana: il martedì e il venerdì. Ogni stimolazione ha avuto una durata di 15 minuti ad una potenza nominale di 40, pari alla potenza efficace di 3,47 W. Sono stati utilizzati due gruppi : uno di controllo (non stimolato) ed un gruppo trattato (stimolato) ognuno costituito da due topi APPPS1.

I topi, prima di ogni trattamento, venivano anestetizzati al fine di poterli stimolare mediante i due elettrodi esterni che venivano appoggiati sulla cute che ricopre il cranio in una zona compresa tra le orecchie e gli occhi dell'animale, in modo che la stimolazione avvenisse il più vicino possibile alla zona cerebrale.

Per favorire una stimolazione più efficace, cioè migliorare la trasmissione del campo oscillante veniva spalmato nella zona dove poggiano gli elettrodi e sugli elettrodi stessi un gel conduttivo che a trattamento concluso si rimuoveva dalla cute.

Ogni topo è stato mantenuto ad una temperatura di 37°C per la durata di tutto il trattamento. Prima di ogni trattamento e subito dopo si misurava la temperatura corporea del topo per verificare che la stimolazione non provocasse aumenti o diminuzioni drastiche di temperatura che avrebbero provocato danni vitali al topo.

Alla fine del trattamento il topo veniva lasciato su di un lettino termo riscaldato fino alla ripresa della normale attività.

La durata del trattamento è stata di 6 settimane, al termine delle quali i topi sono stati sacrificati ed il cervello utilizzato per analisi quantitative e qualitative di produzione della proteina  $\beta$ -amiloide tramite test ELISA e tecniche di immunoistochimica.

#### Protocollo sperimentale:

- anestetizzare i topi da trattare
- posizionare il topo da stimolare sullo stereotassico dotato di *earbar* e di *toothbar*, che consente di bloccare fermamente il capo dell'animale
- poggiare il topo precedentemente bloccato su un lettino termostato che mantiene una temperatura costante di 37° C

- misurare la temperatura del topo prima dell'inizio della stimolazione
- spalmare il gel conduttivo sulla cute del topo, nella zona tra gli occhi e le orecchie, e sugli elettrodi
- posizionare gli elettrodi, tenuti in sede da due manipolatori meccanici, sul cranio del topo
- iniziare la stimolazione a potenza 40 (pari alla potenza efficace 3,47 W) per 15 minuti ciascuno
- misurare la temperatura del topo appena finita la stimolazione
- rimuovere gli elettrodi, pulire la cute del topo e gli elettrodi dal gel conduttivo
- adagiare il topo stimolato su un lettino termoriscaldato, affinché riprenda le sue normali attività vitali
- ripetere la procedura, due volte a settimana (martedì e venerdì) per 6 settimane.

Per uniformità dei dati anche i topi non trattati sono stati anestetizzati contemporaneamente a quelli trattati.

### 2.5.2 Test su cellule H4

Sono stati effettuati tre cicli di stimolazioni suddivisibili in due gruppi: le stimolazioni a 40 pari a potenza efficace 3,47 W e le stimolazioni a 50 pari a potenza efficace 6,56 W.

La modalità sperimentale è stata la stessa per tutti e tre i cicli di trattamento: sono state utilizzate petri di 35 mm di diametro suddivise in due gruppi, le "stimolate" effettivamente sottoposte al trattamento e i "controlli" utilizzati come confronto.

Le stimolazioni avvengono all'interno di una cappa a flusso laminare, sterilizzata inizialmente tramite ultravioletti. Si posiziona la petri sopra l'elettrodo adesivo di terra, mentre l'elettrodo si posiziona all'interno della stessa, in modo che sia a contatto diretto con il terreno di coltura. Dopo ogni stimolazione, le petri vengono riposte nell'incubatore, con condizioni ideali per la riproduzione cellulare, in quanto sempre ad una temperatura di 36,5 °C ed una concentrazione di anidride carbonica del 5%. Quando necessario, in generale al terzo giorno, si rinfresca il terreno di coltura.

Per tenere conto dei cambiamenti e dei progressi sia all'inizio che alla fine del periodo di stimolazione le cellule vengono fotografate tramite fotocamera CCD applicata ad un microscopio Nikon Eclipse 80i in campo chiaro, che fornisce un ingrandimento di 40x. Tali foto hanno permesso il conteggio delle cellule presenti.

I materiali necessari ad effettuare le stimolazioni sono quindi:

- petri di 35 mm di diametro contenenti cellule H4 (controlli e stimulate)
- dispositivo Raxon-Age con relativi elettrodi
- incubatore
- cappa a flusso laminare
- microscopio collegato a fotocamera.

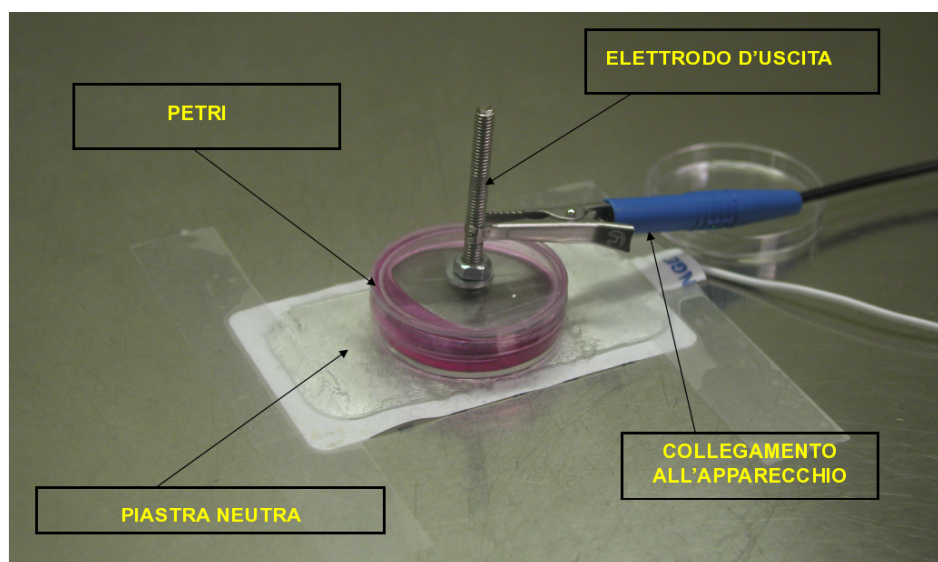


Figura 2.1: Petri sottoposta al trattamento

### 2.5.3 Stimolazione a 40 a lungo periodo

In precedenti sperimentazioni sono state effettuate stimolazioni a potenza 40 (pari a potenza efficace 3,47 W) su cellule H4 di 10 minuti ciascuna per una durata di 3 giorni. Poiché i risultati sono stati positivi ma non decisivi, si è deciso di protrarre la stimolazione a più di 3 giorni al fine di verificare l'effetto della stimolazione a lungo termine.

Sono state quindi allestite delle petri ad una densità tale da permetterne il mantenimento per un periodo più lungo e potere osservare l'effetto della stimolazione per un tempo maggiore. Nello specifico la stimolazione è durata 11 giorni oltre i quali era impossibile andare in quanto le cellule dei controlli sono risultate quasi completamente a confluenza.

Il primo ciclo di stimolazioni è stato effettuato su 8 petri: 4 controlli e 4 stimulate. Le cellule, stimulate e di controllo, prima e dopo l'intero periodo del trattamento sono state fotografate, riprendendo per ogni petri dieci zone casualmente distribuite.

**Protocollo sperimentale:**

- allestire 8 petri di cellule H4 con densità adatta ad una stimolazione a lungo termine, suddividendole nei due gruppi stimulate/controlli
- monitorare le cellule prima del trattamento con relative fotografie
- stimolare una volta al giorno con il Rexon-Age le petri "stimolate" a potenza 40 per la durata di 10 minuti
- rinfrescare il terreno di coltura al terzo giorno
- monitorare le cellule a fine trattamento con relative fotografie.

**2.5.4 Stimolazione a 50**

Per questa sperimentazione sono state utilizzate 20 petri di 35 mm di diametro, di cui 10 controlli e 10 stimulate, considerate quindi come coppia. Sono stati effettuati due cicli di stimolazione di 4 giorni ciascuna, ad una potenza 50 (pari alla potenza efficace 6,56 W) per 10 minuti. Le cellule, stimulate e di controllo, prima e dopo l'intero periodo del trattamento sono state fotografate, riprendendo per ogni petri dieci zone casualmente distribuite.

**Protocollo sperimentale:**

- allestire 20 petri di cellule H4, suddividendole nei due gruppi stimulate/controlli
- monitorare le cellule prima del trattamento con relative fotografie
- stimolare una volta al giorno con il Rexon-Age le petri "stimolate" a potenza 50 per la durata di 10 minuti
- rinfrescare il terreno di coltura al terzo giorno
- monitorare le cellule a fine trattamento con relative fotografie.

## Capitolo 3

# Risultati

### 3.1 Elaborazione dati

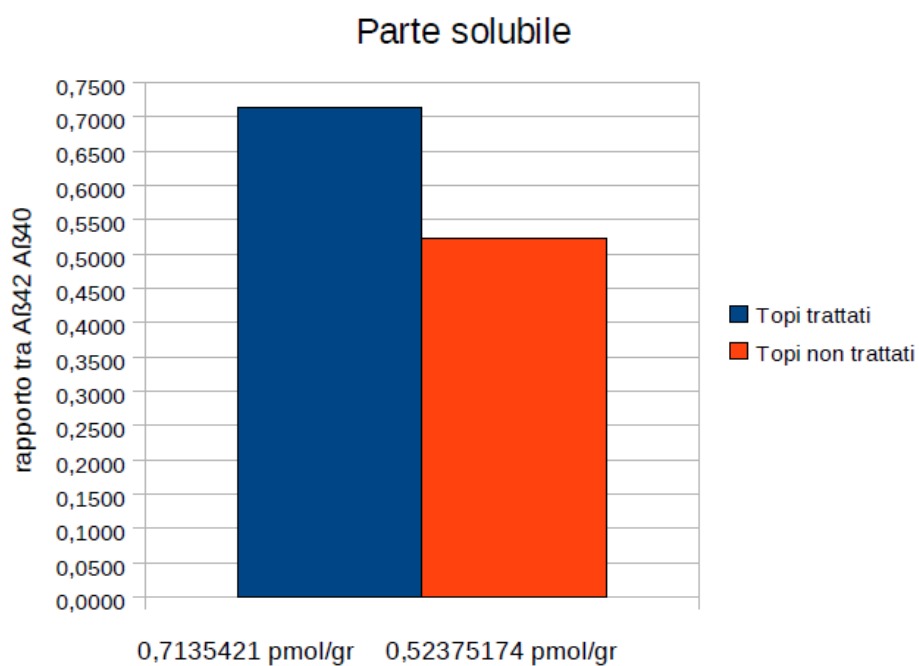
#### 3.1.1 Test su topi APPPS1

##### **ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**

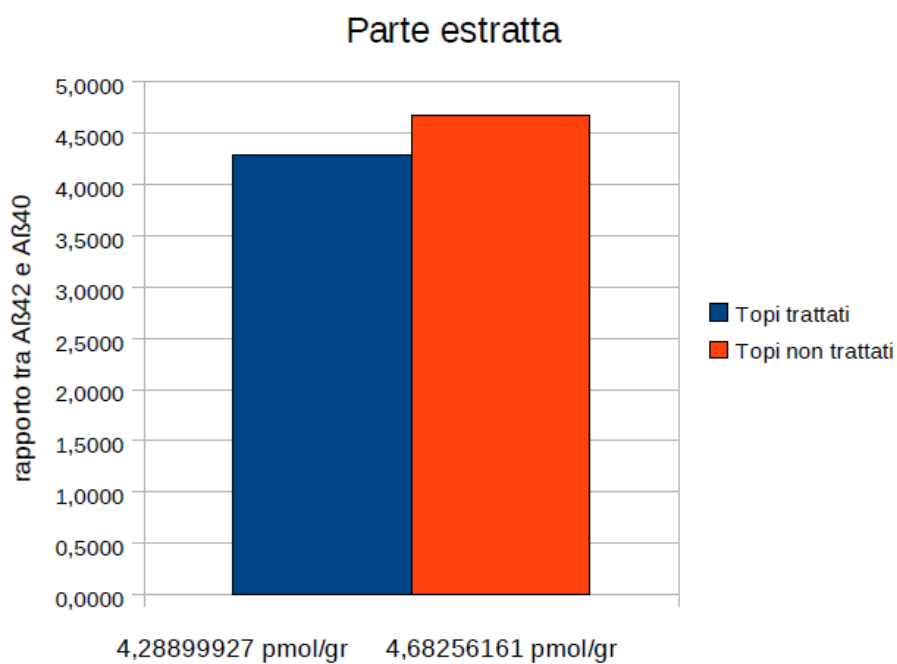
Il test ELISA è stato effettuato in collaborazione con il Laboratorio di Scienze Biomediche Sperimentali gestito dalla dottoressa Fasolato Cristina del Dipartimento di Farmacia di Padova. E' un test a fluorescenza di analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di un dato antigene, nel nostro caso la beta-amiloide tramite l'utilizzo di uno specifico anticorpo. Il test è stato eseguito con il kit commerciale *human/rat beta amyloid kit (WAKO-Germany)* effettuando l'isolamento della proteina A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 attraverso protocolli sperimentali che permettono la purificazione della proteina.

Questo test ha permesso di valutare la differenza di concentrazione di beta-amiloide nei topi trattati e nei topi non trattati. In particolare la *parte solubile* di beta-amiloide risulta maggiore (0,7135421 pmol/gr) nei topi trattati rispetto ai topi non trattati (0,52375174 pmol/gr). Nel caso della *parte estratta* invece non c'è una notevole differenza tra la concentrazione di beta-amiloide nei topi trattati (4,28899927 pmol/gr) e quelli non trattati (4,68256161 pmol/gr), anche se si nota una leggera diminuzione nei topi trattati.

Questo è un buon risultato in quanto si ipotizza che la stimolazione tramite Rexon-Age possa portare ad un distacco della proteina A $\beta$ 1-40 e A $\beta$ 1-42 dalla membrana, rendendola solubile ed impedendone quindi la deposizione in aggregati. Interessante è il dato della componente estratta leggermente superiore dei non trattati rispetto ai trattati, il quale supporta l'ipotesi dell'aumentata solubilizzazione della proteina in soggetti trattati rispetto al controllo.



(a)



(b)

Figura 3.1: Istogramma del rapporto tra A $\beta$ 42 e A $\beta$ 40 di parte solubile 3.1(a) e parte estratta 3.1(b)

*Si ringrazia il Dottor Lazzari Cristian per lo svolgimento del test ELISA.*

### **Immunoistochimica**

L'immunoistochimica è stata effettuata tramite una collaborazione con l'Università di Verona ed è una tecnica volta a evidenziare, in una sezione di tessuto, determinate sostanze attraverso l'utilizzo di anticorpi marcati, tale da rendere evidente il complesso che si viene a creare. L'immunoistochimica ha evidenziato le placche amiloidi nei topi trattati e non, anche se non ha sottolineato differenze sostanziali tra i due gruppi. Questo risultato probabilmente dipende dall'età dei topi (7 settimane) sottoposti al trattamento e dalla durata (6 settimane) del ciclo di stimolazione.

Per sperimentazioni future si suggerisce quindi di iniziare la stimolazione con topi di almeno 3 mesi d'età e di protrarre il trattamento a una durata di almeno 4 mesi. Infine anche la durata della stimolazione è importante in quanto 15 minuti sembrano esser pochi, è quindi necessario aumentare tale stimolazione per almeno 20 minuti a trattamento.

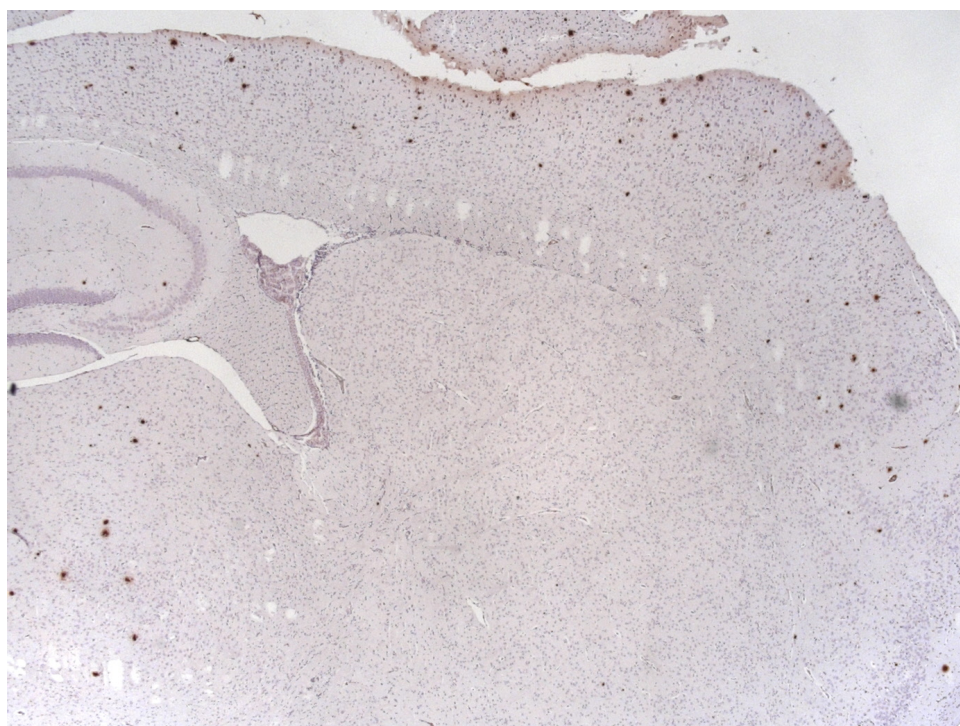


Figura 3.2: Nella figura i puntini evidenziati rappresentano le placche amiloidi

### 3.1.2 Test su cellule H4

L'elaborazione dati riguardante le cellule di astrocitoma umano consiste nel calcolo del tasso di crescita. Questo al fine di verificare eventuali differenze tra le cellule stimulate e quelle di controllo. Le immagini per la conta cellulare sono state prese a 4x, attraverso un microscopio in campo chiaro, prima e dopo la stimolazione. Tali immagini sono state migliorate tramite un filtro, in particolare aumentandone il contrasto per rendere più visibili i nuclei delle cellule tramite il programma *ImageJ*.

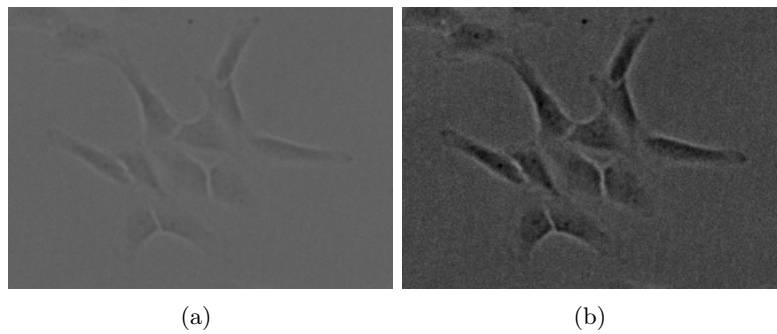


Figura 3.3: Foto cellule prima 3.3(a) e dopo 3.3(b) applicazione del filtro contrasto di ImageJ

Nella figura 3.4 sono messe a confronto l'aspetto di come si mostra una coltura di cellule H4 stimulate a 40 rispetto ai controlli non stimolati. Si può notare come già una blanda stimolazione sembra ridurre la crescita nelle cellule trattate rispetto le non trattate. La scala è indicata con la barra in basso a destra, corrispondente a 100  $\mu\text{m}$ .

Per calcolare i tassi di crescita è stata utilizzata la seguente formula:

$$T = \frac{N_f - N_i}{N_i}$$

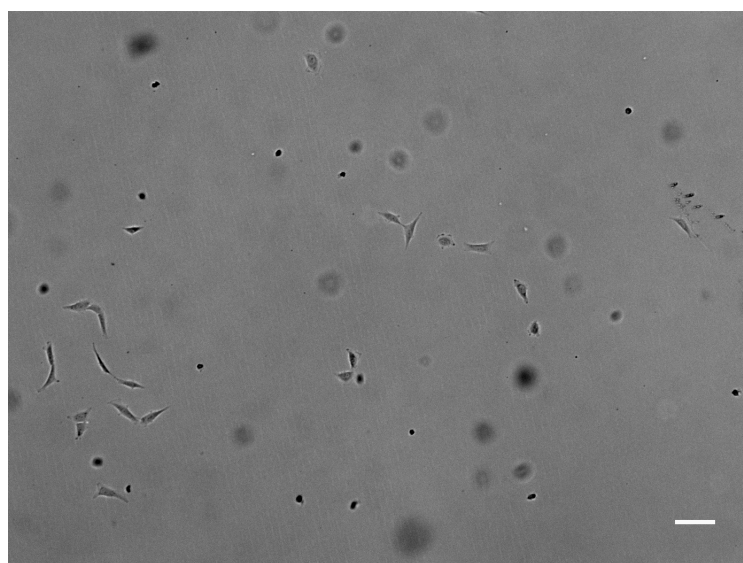
dove

$N_i$  = numero iniziale cellule (pre-trattamento)

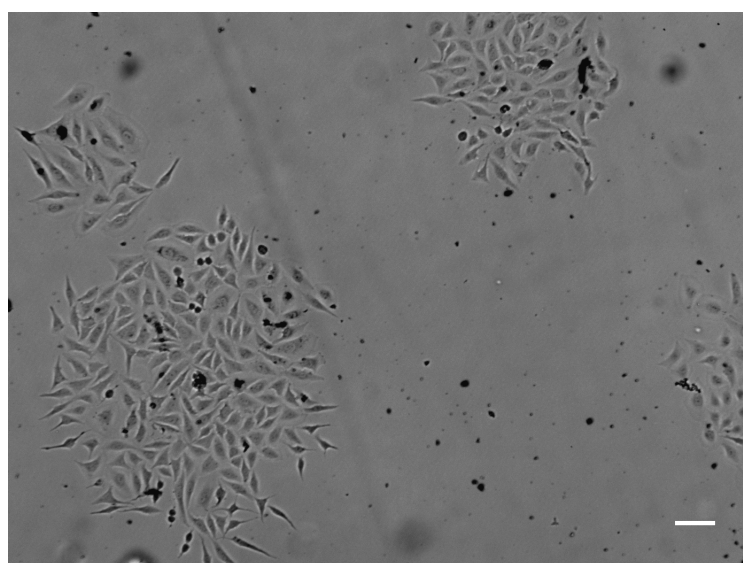
$N_f$  = numero finale cellule (post-trattamento)

Per calcolare la SEM – Standard error of the mean (o errore standard) è stata utilizzata la seguente formula:

$$SEM = \frac{\sqrt{\frac{\sum_1^n (x_m - x_i)^2}{n}}}{\sqrt{n}}$$



(a)



(b)

Figura 3.4: Foto cellule prima 3.4(a) e dopo 3.4(b) il trattamento

che permette di valutare la variabilità statistica dei risultati, ovvero la precisione dei dati acquisiti. Si utilizza l'errore standard invece della deviazione standard, in quanto da una stima della variabilità del tasso di crescita.

### 3.1.3 Stimolazione a 40 a lungo periodo

Si riporta in seguito l'istogramma relativo al tasso di crescita delle petri stimolate e quelle non stimolate, per una stimolazione di durata complessiva di 11 giorni a potenza 40 (pari a potenza efficace 3,47 W).

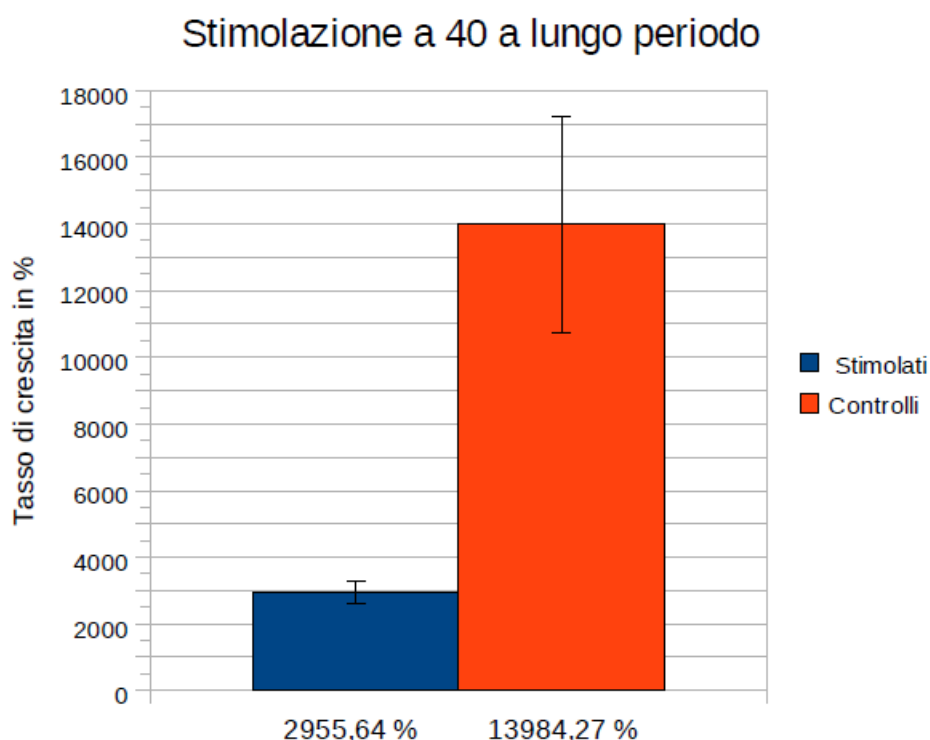


Figura 3.5: Iistogramma del tasso di crescita a stimolazione 40.

Dopo 11 giorni di trattamento le cellule delle petri stimolate sono aumentate del 2955,64% mentre le cellule delle petri controllo sono aumentate del 13984,27%. Si nota quindi una notevole differenza di tasso di crescita tra i due gruppi, la cui differenza è pari a 11028,63%. L'errore standard per i controlli (3239,49%) è circa 5 volte quella delle petri stimolate (669,73%) e associa alla stima un'incertezza abbastanza elevata, tipica delle analisi su sistemi biologici.

Questo è comunque un risultato incoraggiante, anche se c'è da tenere in considerazione che le petri erano state allestite ad una densità tale da permetterne il mantenimento per un periodo più lungo, cioè significa che le cellule a inizio trattamento erano relativamente rade.

### 3.1.4 Stimolazione a 50

Si riporta in seguito l'istogramma della valutazione complessiva relativo al tasso di crescita delle petri stimulate e quelle non stimulate, per i due cicli di stimolazione di durata complessiva di 4 giorni ciascuno a potenza 50 (pari a potenza efficace 6,56 W).

#### Valutazione complessiva

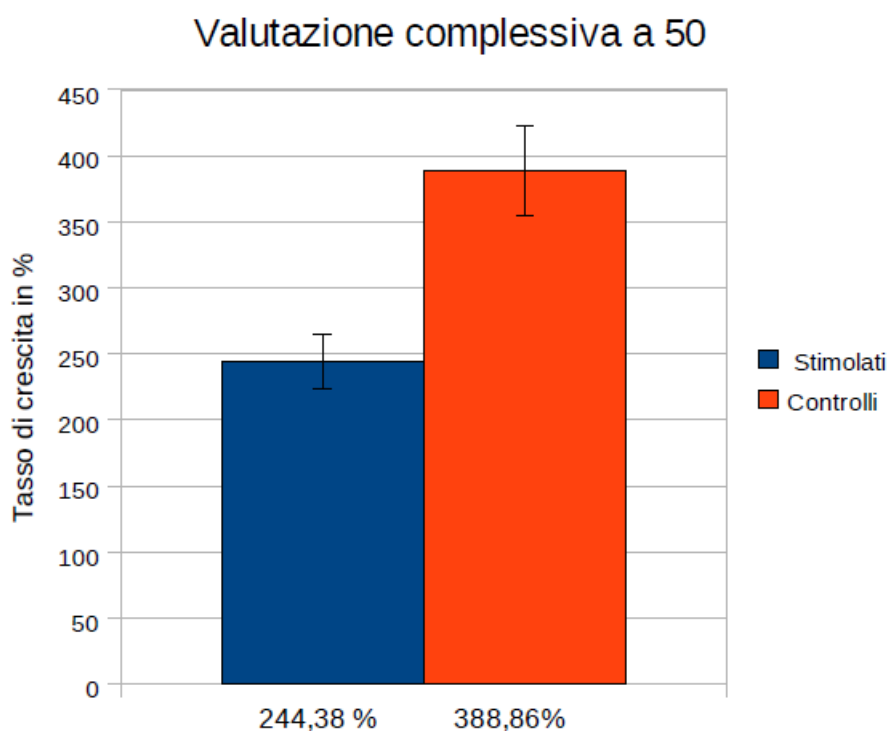


Figura 3.6: Istogramma del tasso di crescita a stimolazione 50.

I dati sperimentali evidenziano una diminuzione nei tassi di crescita delle cellule stimulate (244,38 %) rispetto alle cellule dei controlli (388,86 %). L'errore standard di stimulate (42,77 %) e controlli (68,10 %) risulta simile, grazie al numero elevato di campioni considerati. La differenza tra i due tassi di crescita quindi è abbastanza significativa anche rispetto all'errore di stima.



## Capitolo 4

# Conclusioni

### 4.1 Topi APPPS1

Dai risultati ottenuti tramite i test ELISA e immunostochimica volti a valutare l'effetto del Rexion-Age sulla concentrazione della proteina beta-amiloide a livello di membrana cellulare, si osserva che vi è un leggero aumento della parte estratta di  $\frac{A\beta_{42}}{A\beta_{40}}$  nei topi trattati rispetto a quelli non trattati, mentre la parte estratta rimane circa allo stesso livello anche se si assiste ad una leggera diminuzione nei trattati.

Lo studio svolto era comunque un *primo test*, che nonostante sembri confermare la correlazione tra l'applicazione della terapia e l'inibizione di deposizione della proteina beta-amiloide non è statisticamente affidabile in quanto i casi presi in esame sono troppo pochi. Ha comunque dimostrato che il trattamento non ha effetti dannosi per la salute dei topi.

Quindi i risultati ottenuti da questa sperimentazione preliminare anche se non significativi farebbero sperare in una possibile applicazione di questo metodo terapeutico. In particolare si potrebbero avere risultati più marcati aumentando l'età dei topi trattati, il tempo giornaliero di stimolazione e la durata totale del trattamento.

### 4.2 Prospettive future

La sperimentazione svolta era del tutto preliminare, in quanto gli studi in questo campo sono ancora in evoluzione. Questo studio si svilupperà quindi con sperimentazioni future, che testeranno topi APPPS1 di età minima di 3 mesi per una durata di almeno 4 mesi e con durata del singolo trattamento di almeno 20 minuti.

### 4.3 Cellule H4

Dai risultati ottenuti con i test volti a valutare l'effetto del Rexion-Age sulla proliferazione cellulare, si osserva una diminuzione nel tasso di crescita delle cellule stimulate in tutti e tre i trattamenti effettuati. Nonostante la diminuzione del tasso di crescita sia un fattore costante in tutte le sperimentazioni svolte la variabilità statistica è tendenzialmente abbastanza elevata, in quanto è legata alla procedura adottata, che non consente una valutazione accurata del numero di cellule poiché i campi fotografati sono sempre casuali e non verificano l'andamento preciso della stessa zona di cellule. Inoltre bisogna ricordare che l'analisi riguarda un sistema biologico, che è quindi influenzato da numerosi fattori non direttamente controllabili. È quindi plausibile che i tassi di crescita possano essere molto diversi tra loro e questo influenza l'errore standard.

La correlazione fra l'applicazione della terapia e la diminuzione del tasso di crescita sembra comunque confermata in tutti i test.

Per quanto riguarda gli effetti di una stimolazione prolungata, il problema che si presenta è la crescita cellulare che in pochi giorni occupa l'intera superficie della petri, quindi bisognerebbe valutare un numero minore di cellule iniziali tali da non compromettere il ciclo cellulare ma che permetta di calcolare i tassi di crescita anche dopo 15 giorni di trattamento.

Essendo questa sperimentazione una valutazione statistica sarebbe opportuno effettuare ulteriori test volti a diminuire per quanto possibile, la variabilità. In particolare bisognerebbe sottoporre la cellule stimulate e i controlli alle stesse condizioni di stress:

- durante la stimolazione delle petri, portare le corrispondenti petri controllo sotto la cappa a flusso laminare per l'intera durata del trattamento, per verificare che non sia lo sbalzo termico tra l'incubatore e l'ambiente esterno a provocare la diminuzione del tasso di crescita
- durante la stimolazione delle petri, introdurre l'elettrodo anche nelle corrispondenti petri controllo senza avviare però la stimolazione, per verificare che non sia l'introduzione di un corpo estraneo a provocare la suddetta diminuzione del tasso di crescita
- segnare delle zone campione che saranno poi utilizzate per tutte le fotografie ed i relativi conteggi, in modo da poter monitorare lo stesso campo ed ottenere quindi un numero più elevato di campioni da confrontare
- osservare un eventuale mutamento morfologico
- aumentare la potenza di stimolazione fino a 17,88 W (potenza nominale di 70).

# Bibliografia

- [1] Marco Trabucchi, *Le demenze*. UTET SCIENZE MEDICHE, 4a edizione.
- [2] Black SE, *The search for diagnostic and progression markers in AD: so near but still too far*. *Neurology* 1999; 52:1533-1534.
- [3] Blacker D, Tanzi R., *The Genetics of Alzheimer Disease*. *Arch Neurol* 1998;55:294-296.
- [4] Blennow K, Hampel H., *CSF markers for incipient Alzheimer's Disease*. *Lancet Neurology* 2003;2:605-613.
- [5] Adey WR (1993), *Biological Effects of Electromagnetic Fields*. *Journal of Cellular Biochemistry* 51:410-416.
- [6] *Use of Electrical and Magnetic Stimulation in Orthopedics and Traumatology*. CONSENSUS CONFERENCE Bologna, 11 June 1997.
- [7] French PW, Donnellan M, McKenzie DR (1997), *Electromagnetic radiation at 835 MHz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line*. *Bioelectrochem and Bioenerg.* 43: 13-18.
- [8] Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y, (2004), *Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields*.
- [9] Gary W. Arendash, Juan Sanchez-Ramos, Takashi Mori, Malgorzata Mamcarz, Xiaoyang Lin, Melissa Runfeldt, Li Wang, Guixin Zhang, Vasyl Savad, Jun Tan and Chuanhai Cao (2009), *Electromagnetic Field Treatment Protects Against and Reverses Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease Mice*.
- [10] M. Cotelli, R. Manenti, S. F. Cappa, O. Zanetti and C. Miniussi (2008), *Transcranial magnetic stimulation improves naming in Alzheimer disease patients at different stages of cognitive decline*. *European Journal of Neurology*.

- [11] Delgado JMR, Leal J, Monteagudo JL. Garcia MG X1982), *Embryological changes induced by weak. extremely low frequency electromagnetic fields*. J Anat 134:553-551.
- [12] Luben RA (1991), *Effects of low-energy electromagnetic fields (pulsed and DC) on membrane signal transduction processes in biological systems*. Health Phys 61:15-28.
- [13] McGivern RM, Sokol RZ, Adey WR (1990), *Prenatal exposure to a low frequency electromagnetic field demasculinizes adult scent marking behavior and increases accessory sex organ weight in rats*. Teratology 41:1-8.
- [14] Litovitz TA, Krause D, Penael M, Elson EC, Mullins JM (1993), - *The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity*.
- [15] Prof. Luigi Corti, Ing. Gianantonio Pozzato, *Risonanza Quantica Molecolare e le sue applicazioni cliniche*.
- [16] Prof. Carlo Reggiani(2005), *Effetti di correnti ad alta frequenza e bassa intensità: biostimolazione e rigenerazione cellulare*.
- [17] Prof. Carlo Reggiani (2007)), *Biophysical effects of high frequency electrical field (4-64 MHz) on muscle fibers in culture*. Basic and Applied Myology: 49.
- [18] Moolenaar WH, Aerts WJ, Tertoolen LGJ, Delast SW 11986 , *The epidermal growthfactor induced calcium signal in A431 cells*. J Biol Chem 261:279-285.
- [19] Wilson BW, Anderson LE (1990), *Electromagnetic field effects on the pineal gland*. In Wilson BW, Stevens RG, Anderson LE ( *Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields: The Question of Cancer*. Columbus, Ohio: Battelle Press, pp 159-186.
- [20] Byus CV, Lundak RL, Fletcher R31. Adey (1984), *Alterations in protein kinase activity following exposure of cultured lymphocytes to modulated microwave fields Bioelectromagnetics*. 5:34-51.
- [21] Maria Rosaria Scarfi, *Effetti biologici dei campi elettromagnetici nella sperimentazione in vitro*.
- [22] *Classificazione Internazionale delle malattie per l'Oncologia*. Terza edizione, copyright 2000, WHO.
- [23] Robbins e Cotran, *Le basi patologiche delle malattie*. edizione McGraw Hill.

[24] Harrison, *Principi di medicina interna*. edizione El sevier.

[25] *Sito dell'azienda: [www.rexon-age.it](http://www.rexon-age.it).*

[26] *Sito dell'azienda: [www.vesalius.it](http://www.vesalius.it).*