



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

TESI DI LAUREA TRIENNALE

**ANALISI SULLA VITALITÀ DELLE CELLULE DI  
GLIOMA UMANO SOTTOPOSTE A CAMPI  
ELETTROMAGNETICI AD ALTA FREQUENZA**

RELATORE: PROF. ALFREDO RUGGERI

CORRELATORE : PROF. STEFANO VASSANELLI

LAUREANDO : AREFIN SYEDA SHEAM

MATRICOLA: 580406

# Indice generale

1 INTRODUZIONE.....	3
1.1 <i>Le Cellule Gliali</i> .....	3
1.2 <i>I Gliomi</i> .....	6
1.3 <i>Campi elettromagnetici e le cellule</i> .....	11
1.4 <i>La Risonanza Quantica Molecolare</i> .....	14
1.5 <i>Il Rexon-Age</i> .....	16
2 MATERIALI E METODI.....	18
2.1 <i>H4</i> .....	18
2.2 <i>Soluzioni Utilizzate</i> .....	19
2.3 <i>Rexon-Age</i> .....	20
2.4 <i>Test di mortalità</i> .....	21
2.5 <i>Test della temperatura</i> .....	23
2.6 <i>Stimolazione di colture di astrocitoma</i> .....	25
3 RISULTATI.....	28
3.1 <i>Test di mortalità</i> .....	28
3.2 <i>Test della temperatura</i> .....	29
3.3 <i>Stimolazione di colture di astrocitoma</i> .....	32
4 CONCLUSIONI.....	34
5 BIBLIOGRAFIA.....	35

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 *Le Cellule Gliali*

Le cellule gliali costituiscono il 40% delle cellule del nostro sistema nervoso centrale e formano la nevroglia. Essi sono cellule non neuronali che mantengono l'omeostasi, formano la mielina e fungono da protezione e supporto alle cellule nervose. Inoltre, provvedono al rifornimento di ossigeno dei neuroni e li mantengono separati l'uno dall'altro, distruggono patogeni e le cellule nervose morte. Modulano anche la trasmissione neuronale.

Queste cellule sono molto importanti già a partire dai primissimi stadi della formazione dell'embrione. Infatti, essi regolano la migrazione dei neuroni e producono molecole che modificano la crescita degli assoni e dei dendriti.

Recenti studi hanno dimostrato che le cellule gliali del cervelletto e dell'ippocampo partecipano attivamente alle sinapsi, regolando il rilascio e l'eliminazione dei neurotrasmettitori dalla fessura sinaptica, e rilasciando fattori quali l'ATP che modulano la fase presinaptica. Inoltre, studi in vitro sugli astrociti, un tipo di glia del SNC, hanno evidenziato anche la produzione stessa di neurotrasmettitori.

Esistono due tipologie di glia: la microglia e la macroglia.

Le cellule della microglia sono macrofagi specializzati capaci di fagocitosi che proteggono i neuroni del SNC. Sono mobili e si moltiplicano quando il cervello è danneggiato. Sono principalmente adibiti alla protezione e al supporto dei neuroni.

Le cellule della macroglia possono essere di diversi tipi a seconda delle funzioni che ricoprono.

- **ASTROCITI :**

fanno parte del SNC e sono le più abbondanti. Presentano numerose protuberanze che ancorano i neuroni al rifornimento di sangue. Regolano l'ambiente extracellulare dei neuroni rimuovendo gli ioni in eccesso, ad esempio il potassio, e riciclando i neurotrasmettitori rilasciati durante le sinapsi. In generale si dividono in protoplasmico e fibroso, che sono simili nelle funzioni ma differiscono nella morfologia e nella distribuzione. Gli astrociti protoplasmici sono corti e molto ramificati e si trovano nella materia grigia. Quelli fibrosi invece sono sottili e lunghi con meno ramificazioni e si trovano, invece, nella materia bianca. Alcuni studi sugli astrociti fanno pensare che siano collegati al sistema sanguigno del cervello e che abbiano un ruolo importante nella sindrome di Alzheimer.

- **OLIGODENDROCITI :**

sono cellule del SNC che ricoprono gli assoni dei neuroni con la propria membrana cellulare formando così una differenziazione specializzata della membrana stessa chiamata guaina mielinica. La speciale guaina funziona da isolante e aiuta alla trasmissione delle sinapsi negli assoni del neurone.

- **EPENDIMOCITI:**

sono cellule che rivestono le cavità del SNC e formano i ventricoli. Essi rilasciano fluido cerebrospinale e lo aiutano a circolare nel sistema. Si ritiene, inoltre, che possano comportarsi come cellule staminali neuronali.

- **CELLULE DI SCHWANN:**

hanno funzioni simili ai oligodendrociti. Infatti, queste cellule mielinizzano gli assoni del sistema nervoso periferico. Hanno anche la capacità di fagocitosi e di promuovere la ricrescita dei neuroni nel SNP.

- **CELLULE SATELLITI :**

sono cellule che circondano i neuroni nei gangli sensitivi, simpatici e parasimpatici. Aiutano a regolare l'ambiente extracellulare, come gli astrociti. Sono estremamente sensibili ad infiammazioni e traumi, inoltre sembrano contribuire in qualche modo a stati patologici, come dolori cronici.

## 1.2 I Gliomi

I tumori che si sviluppano nel sistema nervoso centrale possono avere diversa natura: 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.

Viene comunemente fatta un'altra distinzione nei tumori cerebrali in base alla caratterizzazione istologica. Infatti, dato che le neoplasie della glia rappresentano quasi il 40% di tutti i tumori del SNC, in letteratura si è soliti distinguere i tumori gliali, o chiamati anche gliomi, dai tumori non gliali.

Per classificare i vari tumori in base alla malignità degli stessi, si è soliti dal 1993 ricorrere alla gradazione a 4 livelli proposta dalla World Health Organization (WHO). Esso si basa su quattro caratteristiche istologiche: aumentata cellularità, presenza di mitosi, proliferazione endoteliale, necrosi. Segue una breve descrizione dei vari tipi di tumori gliali suddivisi in base alla citologia e alla classificazione WHO.

- **TUMORI ASTROCITARI**

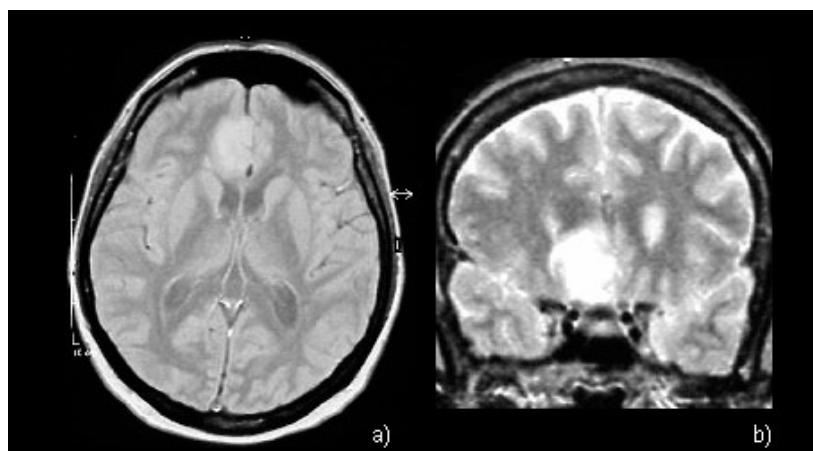
- Astrocitomi di basso grado.**

- Si tratta di neoplasie poco comuni, a istologia benigna e guaribili molto spesso con la sola chirurgia. Sono tumori circoscritti e localizzati poiché hanno una ridotta capacità invasiva, una limitata capacità di crescita e una 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. Nonostante il loro corso relativamente indolente, la maggior parte di questi astrocitomi evolve verso lesioni più anaplastiche, che non sono normalmente guaribili con chirurgia e radioterapia.

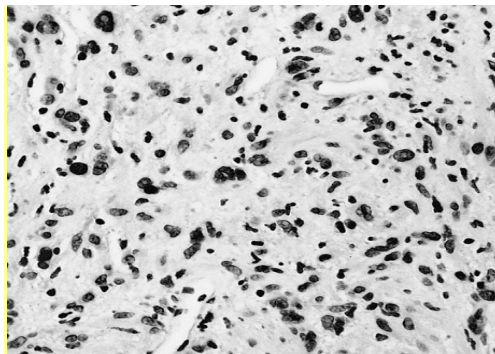
### **Astrocitomi di alto grado.**

**Astrocitoma.** Solitamente viene diagnosticato a una età media di 40-50 anni. Alla TAC si presenta come una lesione ipodensa che non capta il mezzo di contrasto e alla RMN come un'area a elevato segnale di intensità in T2 (fig.2). La capacità infiltrativa della neoplasia e' evidente anche macroscopicamente in quanto i limiti della stessa risultano indefinibili. Ciò pregiudica l'efficacia dei trattamenti di radioterapia e dell'asportazione chirurgica in quanto risulta difficile individuare una esatta area da trattare senza compromettere il tessuto sano circostante. Spesso, perciò, la scelta e' tra colpire piccole fasce potenzialmente sane o rischiare di non colpire aree degenerate non rilevabili, ma che possono originare recidive. Un astrocitoma ben differenziato, che quindi non presenta proliferazione vascolare e necrosi, può permettere una sopravvivenza di molti anni. Purtroppo, molto spesso esso vira in forme molto maligne. La sopravvivenza degli astrocitomi ben differenziati e' di 8 anni in media.



*Fig. 2: risonanza magnetica di un astrocitoma fibrillare frontale destro in sezione assiale (a) e laterale (b)*

- **Astrocitoma anaplastico.** Circa il 50-75% delle recidive tumorali diventano astrocitomi anaplastici. Sebbene non si possa porre una linea di demarcazione netta tra una forma differenziata e una anaplastica perché si è di fronte a uno spettro continuo di neoplasie, la forma anaplastica è caratterizzata da un aumento di cellularità, spiccato pleomorfismo nucleare, ipercromatismo nucleare più evidente e presenza di mitosi. La sopravvivenza media dei pazienti con astrocitoma anaplastico è di 36 mesi.



*Fig 3: Esame microscopico. Il grado di cellularità e di pleomorfismo motivano la diagnosi di **astrocitoma anaplastico.***

**Glioblastoma multiforme.** Il glioblastoma multiforme rappresenta la più grave delle neoplasie astrocitarie diffuse ed anche la più comune. È caratterizzato da una grande attività neoplastica e grande diffusività. Insorge per lo più nella quinta o sesta decade di vita. Solitamente i glioblastomi sono neoplasie secondarie in quanto originano dall'evoluzione di neoplasie astrocitarie di grado inferiore o da recidive delle stesse. Le caratteristiche istologiche sono estremo polimorfismo cellulare, elevata cellularità, mitosi e necrosi. I tipi cellulari che compongono il glioblastoma sono molto vari. Infatti, sono solitamente presenti sia delle cellule giganti e mostruose che sono mitoticamente inattive, sia piccole cellule anaplastiche responsabili della crescita e della diffusione della lesione. La maggioranza dei pazienti affetti da



glioblastoma multiforme trattati con chirurgia e radioterapia muore entro 24 mesi dalla diagnosi.

<b>Distribuzione dei gliomi per sottotipo istologico CBTRUS 1998-2002 (N=25.539)</b>	
<b>Istologia</b>	<b>Percentuale</b>
Glioblastoma*	50,7
Astrocitoma anaplastico*	7,9
Astrocitoma diffuso*	1,7
Astrocitoma pilocitico*	5,7
Altri astrocitomi*	9,1
Oligodendroglioma	9,2
Ependimoma	5,6
Altri	10,1

(\*) Gli astrocitomi (compreso il glioblastoma) rappresentano il 75%ca. di tutti i gliomi.

- **OLIGODENDROGLIOMI**

Gli oligodendrogliomi rappresentano circa il 10-15% di tutti i gliomi. Ciononostante, sono molto importanti per la unicità nella sensibilità alla chemioterapia. Si classificano in oligodendrogliomi di basso grado o anaplastici. La maggior parte dei oligodendrogliomi nasce come neoplasie di basso grado. L'età media a cui viene diagnosticato e' di circa 35 anni. L'aspetto neuroradiologico alla TAC spesso è caratterizzato da grossolane calcificazioni con una distribuzione curvilinea che corrisponde alle circonvoluzioni cerebrali. La sintomatologia comune evidenzia crisi epilettiche ma possono pure segnalarsi deficit neurologici focali, modifiche della personalità e anche gli altri sintomi dovuti alla pressione endocranica (cefalea, vomito, ecc.). L'oligodendroglioma anaplastico risulta caratterizzato da alta cellularità, polimorfismo nucleare, mitosi frequenti, abbondante proliferazione endoteliale e necrosi. Nonostante la loro chemiosensibilità, la mediana di

sopravvivenza va da 3 a 5 anni soltanto. Il trattamento prevede la migliore escissione possibile, seguita da radioterapia.

- **EPENDIMOMI**

L'ependimoma e' una neoplasia che si sviluppa dalle cellule ependimali, che rivestono le cavità ventricolari e del canale midollare. L'incidenza di tali tumori varia tra il 2-6% di tutti i gliomi. Possono colpire ogni età, ma sono più frequenti nelle prime due decadi di vita. Infatti, rappresentano il 10% di tutte le neoplasie cerebrali dell'infanzia e dell'adolescenza. Dell'ependimoma si riconoscono numerose varianti: ependimoma cellulare, ependimoma papillare, ependimoma a cellule chiare ed ependimoma mixopapillare. Le calcificazioni sono comuni a tutte le forme. Gli ependimomi classici sono di basso grado, hanno generalmente lenta crescita e si trasformano in senso maligno più raramente degli astrocitomi. Gli ependimomi anaplastici (maligni), posseggono alto numero di mitosi, marcata iperplasia endoteliale e ampie aree di necrosi.

### **1.3 Campi elettromagnetici e le cellule**

La vita sulla terra si e' sviluppata in un campo elettromagnetico naturale, ma nell'ultimo secolo l'uomo ha drasticamente modificato questo ambiente introducendo campi artificiali che hanno effetti anche a livello cellulare. All'inizio si pensava che questi campi fossero troppo deboli per essere capaci di influenzare funzioni fisiologiche, recenti studi hanno, pero', dimostrato che anche piccoli campi magnetici hanno il potere di interagire con l'espressione di alcune proteine, ormoni, anticorpi e neurotrasmettitori a livello della membrana cellulare. In queste interazioni giocano un ruolo fondamentale gli ioni calcio. Queste nuove ricerche indicano una chiara relazione tra la fisica quantica e i sistemi biomolecolari, piuttosto che una spiegazione legata al classico equilibrio termodinamico associato agli scambi di energia termica.

Numerose ricerche hanno evidenziato che campi a frequenze molto piccole (0-100 Hz) e a radiofrequenze sono coinvolti in importanti processi fisiologici nei vertebrati marini, uccelli e mammiferi. Alcune ricerche in vitro hanno, inoltre, scoperto che una vasta gamma di processi calcio-dipendenti ne sono influenzati come le funzioni della membrana cellulare, meccanismi che regolano la crescita cellulare, modulazione di enzimi intracellulari.

La maggioranza delle cellule presentano un potenziale di membrana a riposo di 0,1 V. Essendo questo potenziale presente su una finissima membrana plasmatica, esso crea una enorme barriera elettrica di circa 10<sup>5</sup> V/cm. Pur essendo questa barriera di gran lunga maggiore delle oscillazioni provocati dai campi elettromagnetici in questione, non c'è dubbio sulla sensibilità ai campi di molti tipi di cellule come i linfociti, gli osteociti, i fibroblasti e le cellule nervose.

I campi di ricerca a cui si sono dedicati medici e biologi negli ultimi anni

sono molto diversi tra di loro:

- meccanismi di accoppiamento tra campi elettromagnetici e i tessuti a livello cellulare [Adey, 1990, 1992a; Hoth and Penner, 1992; Luben, 1991; Moolenaar et al., 1986];
- effetti dei campi sullo sviluppo embrionale e fetale [Delgado et al., 1982; McGivern et al., 1990];
- modulazione del sistema nervoso centrale e le funzioni neuroendocrine [Lerchl et al., 1990; Reiter, 1992; Wilson and Anderson, 1990];
- modifiche nel sistema immunitario [Byus et al., 1984; Lyle et al., 1983, 1988];
- controllo della crescita cellulare e l'azione dei campi elettromagnetici nel promuovere i tumori [Wilson et al., 1990];
- modulazione dell'espressione genetica [Goodman and Henderson, 1988; Phillips et al., 1992];
- applicazioni terapeutiche per rimarginare fratture [Mir et al., 1992; Weaver, 1992].

Le ricerche sui tumori al giorno d'oggi enfatizza sui meccanismi epigenetici, focalizzando sulle disfunzioni della membrana cellulare, piuttosto che sui danni del DNA nel nucleo. [Pitot and Dragan, 1991; Yamasaki, 1991]. La formazione del tumore e' spiegato attraverso un processo a tre fasi : initiation, promotion, progression [Weinstein, 1988]. Tipicamente, l'initiation ha luogo quando un danno nel DNA viene provocato da agenti chimici oppure dalle radiazioni. Il tumore non si forma se non si e' esposti ripetutamente a agenti promotori, molti dei quali agiscono sulle funzioni della membrana plasmatica. Eppure, sono poche le prove che indicano i campi elettromagnetici quali "iniziatori" del tumore. Molti studi in corso sono volti proprio a stabilire se essi possono essere considerati dei promotori a livello della membrana cellulare assieme anche ad altri agenti chimici.

Altre ricerche coinvolgono campi elettromagnetici ad alta frequenza

come quelli generati dagli apparecchi telefonici cellulari. Negli ultimi decenni si pensava che una prolungata esposizione a questi campi potesse nuocere alla salute provocando tumori e degradazione cerebrale. Più recentemente si è scoperto che l'esposizione acuta ad essi può essere una valida alternativa terapeutica per molte patologie.

Questo è un campo della ricerca sulle applicazioni dei campi elettromagnetici ancora da esplorare e sicuramente ricoprirà un ruolo molto importante nel futuro.

## **1.4 La Risonanza Quantica Molecolare**

Il principio della risonanza quantica molecolare si fonda sulla teoria secondo la quale i legami molecolari, sottoposti ad una certa frequenza, reagiscono scindendosi. Infatti, assumendo che l'energia sia racchiusa in quanti, e che l'energia di ogni quanto dipenda dalla frequenza, è stato inizialmente teorizzato che proprio dalla frequenza dipendesse la relazione tra energia somministrata e processi molecolari indotti. Più precisamente esso dipende dalla relazione tra l'energia dei quanti e l'energia di legame delle molecole interessate. Si distinguono due casi: una in cui l'energia dei quanti è diversa dall'energia di legame delle molecole, l'altra in cui l'energia dei quanti e di legame si equivalgono.

Nel primo caso, quando l'energia dei quanti è diversa da quella di legame, le molecole cominciano a vibrare, dando origine a una grande quantità di calore, prodotto macroscopico di un'impennata nell'energia cinetica molecolare, arrivando in fine alla completa rottura dei legami molecolari.

Nel secondo caso, quando l'energia dei quanti e di legame si equivalgono, le molecole, invece di vibrare, entrano in risonanza, spezzando i legami e incidendo i tessuti senza aumento di calore.

Tutte queste acquisizioni inizialmente sono state utilizzate per la realizzazione di un bisturi elettronico a risonanza quantica molecolare, il Vesalius, in grado di tagliare e coagulare ad una temperatura inferiore ai 45°, grazie al quale il danno termico degli interventi chirurgici, cioè la necrosi susseguente all'ustione, è scomparso. Questo è stato però solo l'inizio. Infatti ciò che si è rivelato veramente interessante è come le molecole, sottoposte ad uno spettro di frequenze un po' più ampio e con una più bassa densità di

energia, si allontanino le une dalle altre senza infrangersi, deformando la cellula e dando origine a fenomeni molecolari che confluiscono in un'accelerazione dei processi rigenerativi.

Tutte queste acquisizioni inizialmente sono state utilizzate per la realizzazione di un bisturi elettronico a risonanza quantica molecolare, il Vesalius, in grado di tagliare e coagulare ad una temperatura inferiore ai 45°, grazie al quale il danno termico degli interventi chirurgici, cioè la necrosi susseguente all'ustione, è scomparso.

Partendo dai risultati del Vesalius, è stato realizzato il Rexion-age, un'apparecchiatura capace, utilizzando frequenze leggermente diverse, di indurre una rigenerazione dei tessuti biologici stimolando l'attività delle cellule progenitrici.

## **1.5 Il Raxon-Age**

Il Raxon-Age rappresenta un'applicazione innovativa e diversa, rispetto al bisturi Vesalius, della Risonanza Quantica Molecolare. Infatti, attraverso l'utilizzo di correnti ad alte frequenze e piccole intensità, l'effetto di incisione ottenuto dal Vesalius e' sostituito da una stimolazione che migliora la struttura e la funzionalità dei tessuti in particolare la pelle, i muscoli e i legamenti. Infatti, il Raxon-Age e' attualmente molto usato per le terapie contro il dolore acuto e cronico, terapie antalgiche e anche per trattamenti post-operatori.

Oltre ad essere ampiamente usata anche nel campo della Medicina Estetica per tonificare la pelle e contrastare i segni del tempo e combattere la cellulite e l'acne. Raxon-Age promuove una stimolazione cellulare in modo del tutto peculiare, mantenendo bassa la temperatura del tessuto, ed evitando pertanto gli eventuali rischi ed effetti collaterali che un eccessivo aumento di temperatura potrebbe comportare. Di fatto, la temperatura dei tessuti trattati non supera mai i 42-43° C.

Il Raxon-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.

Il modello dell'apparecchio reso disponibile dalla Telea Electronic Engeneering s.r.l. per il presente progetto e' stato modificato per permettere la stimolazione di colture cellulari allestite in petri da 35 mm. Infatti, dispone di un unico canale d'uscita al quale viene collegato un elettrodo metallico circolare che viene immerso nel terreno di coltura durante le stimolazione. La corrente ad altissima frequenza e' trasmessa direttamente da tutta la superficie dell'elettrodo al terreno di coltura delle cellule. Inoltre, all'apparecchio e' stato aggiunto una piastra neutra in modo da assicurare la chiusura del circuito in



qualsiasi ambiente d'utilizzo, sebbene le frequenze generate siano altissime.

Osservati i diversi effetti di Raxon-Age nei processi cellulari e in particolare la stimolazione di processi rigenerativi, ci ha spinto a ipotizzare l'applicazione del trattamento anche per la terapia di tumori cerebrali come i gliomi. Di fatti, se lo spettro di frequenze del Raxon-Age avesse qualche effetto sulla crescita delle cellule tumorali, la stimolazione potrebbe essere una valida alternativa per combattere le recidive.

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 H4**

Per i seguenti esperimenti sono state utilizzate linee cellulari di glioma umano H4 a morfologia epiteliale. Tali cellule tumorali hanno un ciclo replicativo di 48 ore e vengono mantenute in incubatore a 37°C e atmosfera controllata di CO<sub>2</sub> al 5%(v/v). Le cellule H4 sono state allestite in petri da 35 mm con un adeguato terreno di coltura.

## 2.2 Soluzioni Utilizzate

*Terreno di coltura per H4:*

- D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, addizionato di L-glutammina (Gibco))
- FBS 10% (Foetal Bovine Serum)
- antibiotici (Penicillina 10u/ml, Streptomicina 10 $\mu$ g/ml)

*Soluzione per i lavaggi:*

- PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.4:
  - NaCl 137 mM
  - KCl 2.7 mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM
- Trypan Blue:
  - PBS
  - 0.08% TB

## **2.3 Rexion-Age**

Per le stimolazioni e' stato utilizzato l'apparecchiatura Rexion-Age sviluppato e brevettato dalla Telea Eletronic Engeneering s.r.l.. Esso si basa sul principio della Risonanza Quantica Molecolare e attraverso l'utilizzo di correnti a bassa potenza e ad altissima frequenza promuove la stimolazione dei tessuti. Infatti, il generatore del Rexion-Age produce una corrente a bassa intensità e a frequenze che arrivano fino ai 64 MHz.

Esso e' stato modificato al fine di permettere una più efficace stimolazione delle cellule in petri. Infatti, dispone di un unico canale di uscita al quale e' 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 così permette di chiudere il circuito in qualsiasi evenienza.

### **Dati Tecnici:**

*Tensione d'alimentazione: 230 V*

*Frequenza d'alimentazione: 50/60 Hz*

*Potenza massima assorbita dalla rete: 250VA*

*Potenza massima in uscita: 40W/1500 Ohm*

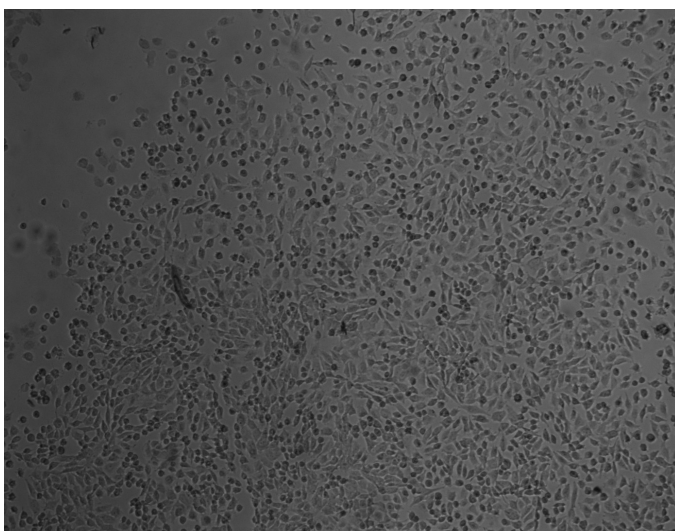
*Frequenza in uscita: spettro in frequenze da 4 MHz a 64 MHz  
(spettro*

*brevettato)*

*Grado di protezione contro ingresso di liquidi: IPX0*

## 2.4 Test di mortalità

Per questo esperimento sono state utilizzate cellule di glioma umano H4 allestite in 10 petri da 35 mm immerse in un terreno di coltura. Ciascuna petri e' stata posizionata su un elettrodo adesivo che fungeva da messa a terra dell'apparecchio e a contatto con il liquido stesso e' stato posizionato un secondo elettrodo di tipo metallico. Ciascun trattamento e' durato dieci minuti e si sono effettuate prove con il macchinario regolato a 40 (3,47 W), 50 (6,56 W), 60 (11,74 W), 70 (17,88 W), 80 (25,75 W) e 90 (35,17 W).



*Illustrazione 1: cellule gliali trattati con Trypan Blue*

Per valutare la tossicità del trattamento sulle cellule tumorali si e' scelto di utilizzare il Trypan Blue, che e' un indicatore vitale colorato in grado di evidenziare e quindi distinguere le cellule vive da quelle morte. Nelle cellule vive il colorante non penetra, mentre in quelle morte, il colorante penetra.

E' stato eseguito un controllo dello stato cellulare pre-stimolazione mediante aggiunta del colorante. Alla fine delle stimolazioni, le petri vengono controllate e analizzate al microscopio per evidenziare eventuali cellule morte in seguito al trattamento.

### **Protocollo sperimentale:**

- *Allestimento 10 petri con 40000 cellule/cm<sup>2</sup>*
- *Lavaggio con PBS 37°C della coltura*
- *PBS 0.08% TB 37°C per 2 min*
- *Controllo cellule vive/cellule morte*
- *Lavaggio con PBS 37°C*
- *Stimolazione per 10 min in terreno di coltura*
- *Lavaggio con PBS 37°C della coltura*
- *PBS 0.08% TB 37°C per 2 min*
- *Controllo cellule vive/cellule morte*

## 2.5 Test della temperatura

Per monitorare e valutare l'eventuale aumento di temperatura a seguito alla stimolazione, è stata ricavata sperimentalmente la curva di variazione delle temperatura post-stimolazione.

L'andamento della temperatura e' stata trovata applicando alle petri con 2 ml di terreno di coltura un trattamento di 10 minuti alle diverse potenze che si possono impostare all'apparecchio Rexon-age. Le potenze regolabili sono da 1 a 100 e la seguente tabella resa disponibile dal costruttore riassume gli effettivi valori fisici applicati alle petri.

### Potenza efficace rilevata

REGOLAZIONE ANTALAGE	V rms [V]	A rms [A]	Potenza efficace [W]
5	4,06	0,005	0,02
10	6,65	0,006	0,04
20	23,79	0,019	0,46
30	43,8	0,034	1,5
40	66,5	0,052	3,47
50	91,1	0,072	6,56
60	119,6	0,098	11,74
70	145	0,123	17,88
80	171,2	0,150	25,75
90	196,7	0,179	35,17
100	219,5	0,206	45,26

### **Protocollo sperimentale:**

- *Allestimento di petri contenenti terreno completo per cellule H4*
- *Aver cura che la temperatura di terreno e stimolatore sia quella ambientale( 19°C)*
- *Registrazione della temperatura pre-stimolo*
- *Stimolazione per 10 min ad una data potenza*
- *Registrazione della temperatura post-stimolo*
- *Ripetere il tutto per tre volte avendo cura di cambiare il terreno e di portarlo a temperatura ambiente*
- *Effettuare tale stimolazione per potenze da 10 a 100 con passo 10.*

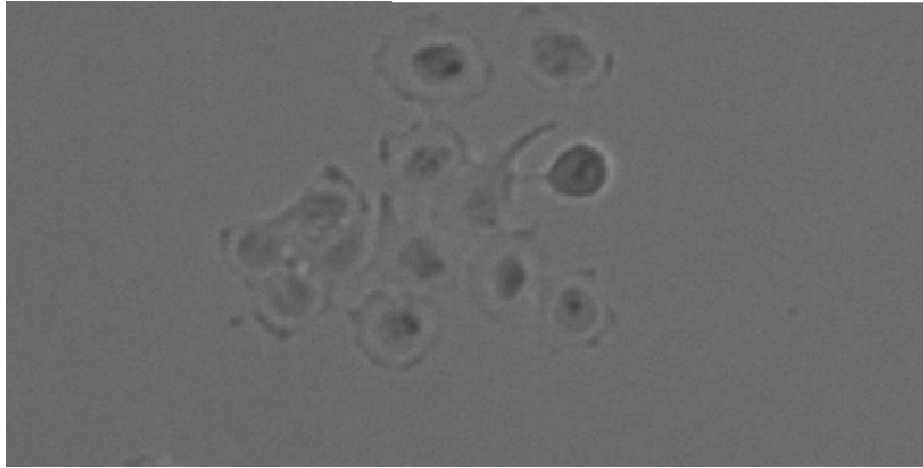


## **2.6 Stimolazione di colture di astrocitoma**

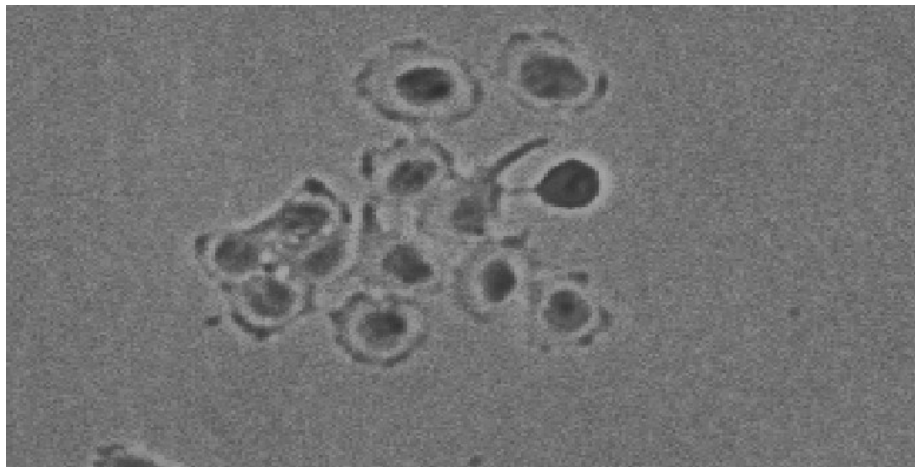
Per valutare gli effetti della stimolazione a Risonanza Quantica Molecolare sul tasso di crescita delle cellule H4, si è deciso di adottare il seguente esperimento. Allestite 32 petri con cellule di glioma umano H4, le petri sono state divise in 2 gruppi. A un gruppo di 16 petri è stata effettuata una stimolazione mediante il Rexion-Age regolato a 40 per 10 minuti al giorno per 3 giorni consecutivi. Le rimanenti petri sono state lasciate come controlli per effettuare un confronto tra i tassi di crescita dei 2 gruppi.

Per poter effettuare la conta cellulare e quindi risalire al tasso di crescita cellulare si è scelto di usare una fotocamera a microscopio Nikon Eclipse 80i e fotografare 15 campi diversi a 4X in campo chiaro, scelti casualmente, per ogni petri, sia del gruppo di stimolazione sia quello dei controlli. Le foto sono state prese all'inizio e alla fine del trattamento, in modo da poter valutare la crescita attraverso il conto delle cellule riprese.

Per facilitare il conto delle cellule è stato usato un filtro in Matlab per aumentare il contrasto delle immagini (`adjust.m`), così da risultare più facile individuare i contorni di ogni cellula. Inoltre, sempre attraverso la programmazione in Matlab, il miglioramento e il salvataggio stesso delle fotografie migliorate in formato `.jpg/.tif` nella directory è stato automatizzato da un secondo programma chiamato `“execute.m”`.



*Dettaglio di una fotografia al microscopio di un campo 4X prima del miglioramento attraverso il filtro.*



*Lo stesso dettaglio della fotografia precedente migliorato in contrasto attraverso il filtro adjust.m. I bordi delle cellule sono molto ben visibili rispetto allo sfondo rendendo l'individuazione più facile.*

**Protocollo sperimentale:**

- *Allestimento di 32 petri con 10000 cellule/cm<sup>2</sup>*
- *Al 3° giorno in coltura rinfrescare il terreno*
- *Tramite microscopio, prendere in ogni petri 15 campi a 4X, scelti in modo casuale, e contare le cellule presenti in ogni campo, ricavando poi la media.*
- *Effettuare la stimolazione per 10 min a 40 di potenza*
- *Mantenere la coltura in un ambiente a temperatura controllata e con 5% CO<sub>2</sub>*
- *Ripetere la stimolazione per tre giorni consecutivi*
- *Tramite microscopio, prendere in ogni petri 15 campi a 4X, scelti in modo casuale, e contare le cellule presenti in ogni campo, ricavando poi la media.*

## **3 RISULTATI**

### ***3.1 Test di mortalità***

La stimolazione delle colture di astrocitoma a diverse intensità ha permesso di dimostrare come una stimolazione di 10 min non sia dannoso alla salute cellulare (analizzata sia con il colorante vitale TB sia mediante osservazioni morfologiche delle cellule) fino alla potenza di 70. Si nota una lieve variazione nell'aspetto delle cellule a potenze superiori a 60, che tuttavia non compromette la vitalità cellulare. Con il Raxon-Age regolato a 80 che equivale a 25,75 W di potenza, molte cellule mostrano una morfologia diversa da quelle allo stato pre-stimolato, con un apprezzabile aumento del numero di cellule morte, in cui l'indicatore vitale Trypan Blue è riuscito a penetrare. E' stata, inoltre, eseguita una prova a 90 (35,17 W) che mostra gli stessi cambiamenti morfologici evidenziati a 80. Le stimolazioni con potenza superiore a 90 non sono state effettuate, in quanto la risposta ad 80 aveva già evidenziato un significativo aumento della mortalità cellulare.

Da queste prime prove e' stato appurato che le cellule trattate fino alla potenza di 70 sono sane e, quindi, si e' deciso di sottoporre le cellule ad una stimolazione cronica per tre giorni con la macchina regolata a 40 che equivale a 3,47 W di potenza.

## **3.2 Test della temperatura**

Per le leggi della termodinamica ci si aspetta un aumento di temperatura del terreno di coltura in quanto ogni volta che si applica il trattamento c'è un trasferimento di energia elettromagnetica che dovrebbe provocare un innalzamento della temperatura prima nell'elettrodo applicato e poi nel terreno di coltura.

Bisogna, quindi, valutare se tale innalzamento è significativo dal punto di vista terapeutico, in quanto una temperatura troppo elevata potrebbe essere controindicato all'applicazione nei pazienti se produce necrosi.

I dati sono stati raccolti seguendo un protocollo ben preciso e studiato. Ogni petri e' stata riempita con 2 ml di terreno di coltura e poi portata a temperatura ambiente, circa 19°C, in modo da poterlo considerare un offset nella rielaborazione successiva dei dati.

Successivamente, si e' deciso di cominciare con un trattamento di 10 minuti con l'apparecchio regolato a 10 e di rilevare la temperatura del liquido attraverso un termometro a raggi infrarossi in due momenti del trattamento: subito prima dell'applicazione dell'elettrodo metallico e subito dopo averlo tolto a fine stimolazione. Questo procedimento e' stato ripetuto aumentando la regolazione dell'apparecchio a passi di 10 ed effettuando tre prove per ciascuna potenza fino al raggiungimento dell'ultima potenza disponibile.

Il fatto di misurare la temperatura subito prima e subito dopo il trattamento ci permette di evitare una dispersione elevata nell'ambiente dell'energia accumulata nel liquido sotto forma di calore dovuto al tempo trascorso dalla fine dell'applicazione e dall'effettiva misurazione della temperatura. Per questo motivo si può ritenere trascurabile l'errore dovuto a tale inconveniente.

I dati ottenuti sono stati raccolti nella seguente tabella e riassunti dal

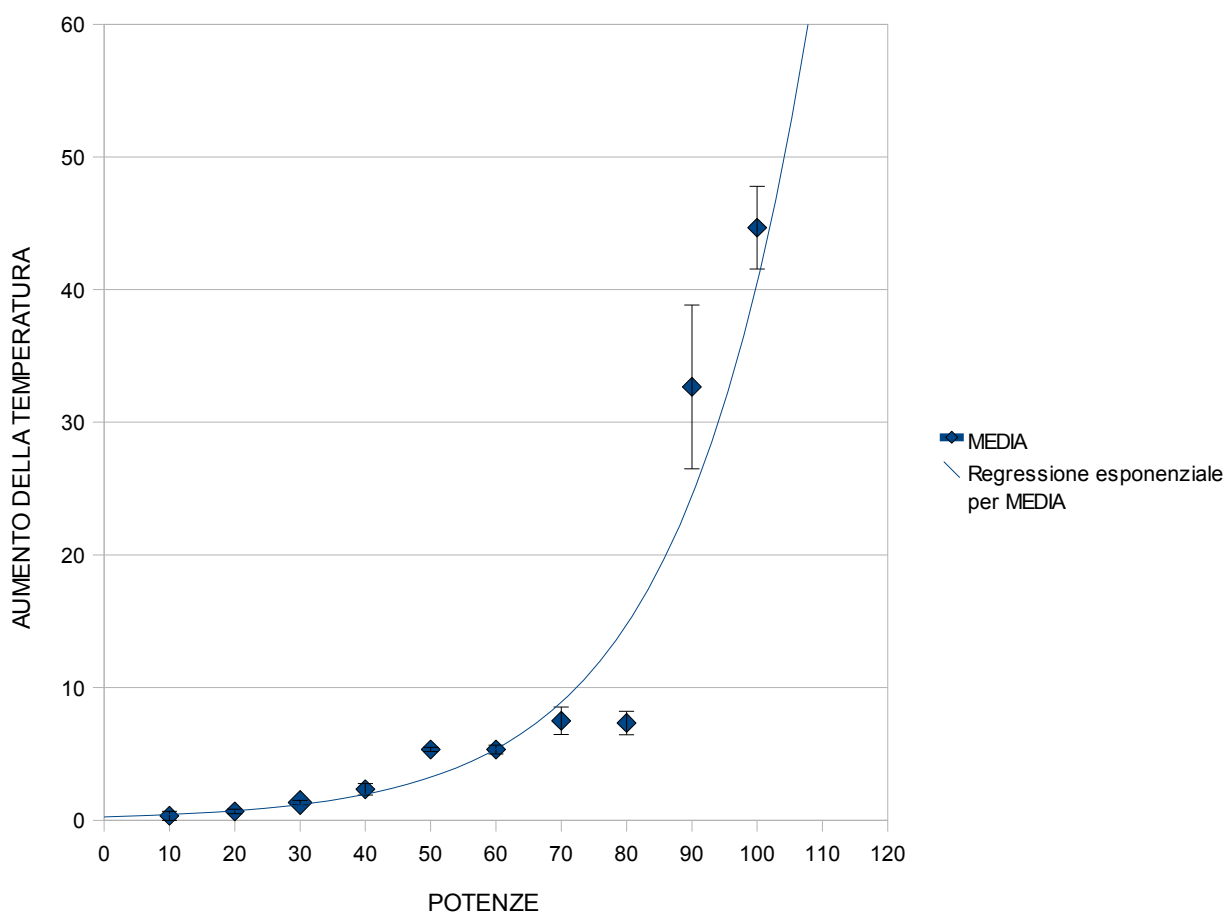
grafico, che mostra un andamento quasi esponenziale con un picco molto elevato alle potenze di 90 e 100, con un aumento pari a circa 45 °C . Nonostante ciò, gli aumenti alle potenze più basse risultano molto contenute. In particolare, a partire dai 50 si assiste ad un aumento di soli 5 °C nel terreno di coltura.

L'aumento di 5°C può essere considerato trascurabile in un contesto in cui le colture cellulari passano da un incubatore mantenuto a 37°C a temperatura ambiente con ben oltre 5 °C di differenza. Si conclude che lo strumento può essere utilizzato con potenze fino al valore di 80 senza indurre variazioni significative di temperatura.

POTENZA	T.PRE	T.POST	MEDIA		DEV.ST.	ERRORE ST.
10	19	19	0,33	0	0,58	0,33
10	19	19		0		
10	19	20		1		
20	19	19,5	0,67	0,5	0,29	0,17
20	19	20		1		
20	19	19,5		0,5		
30	19	20	1,33	1	0,29	0,17
30	19	20,5		1,5		
30	19	20,5		1,5		
40	19	20,5	2,33	1,5	0,76	0,44
40	19	21,5		2,5		
40	19	22		3		
50	19,5	24,5	5,33	5	0,29	0,17
50	19	24,5		5,5		
50	19	24,5		5,5		
60	19,5	24,5	5,33	5	0,58	0,33
60	19	25		6		
60	19,5	24,5		5		
70	18,5	25,5	7,5	7	1,8	1,04
70	19	28,5		9,5		
70	19,5	25,5		6		
80	19	28	7,33	9	1,53	0,88
80	19	26		7		
80	19	25		6		
90	19	40	32,67	21	10,69	6,17
90	19	54		35		
90	19	61		42		
100	19	66	44,67	47	5,39	3,11
100	18,5	57		38,5		
100	18,5	67		48,5		

*Tabella con i valori della temperatura rilevati durante le prove e le relative analisi statistiche*

Il seguente grafico riassume l'andamento della temperatura risultante da questo esperimento e dai dati riassunti nella precedente tabella.



### **3.3 Stimolazione di colture di astrocitoma**

Alla fine delle stimolazioni con il Rexion-Age regolato a 40 (3,47 W) per 3 giorni consecutivi, sono stati valutati i tassi di crescita dei due gruppi di colture, quelli stimolati e non stimolati, attraverso la conta delle cellule. La conta é stata eseguita sulle foto scattate al microscopio di ogni petri. Infatti, per ogni petri avevamo a disposizione 15 campi diversi a 4X in campo chiaro.

Per esprimere i tassi di crescita cellulare, è stato utilizzato il rapporto tra le cellule contate ad inizio esperimento e le cellule contate dopo i tre giorni di trattamento:

A = numero iniziale cellule (pre-trattamento)

B = numero finale cellule (post-trattamento)

*Tasso crescita cellulare* =  $(B-A)/A$

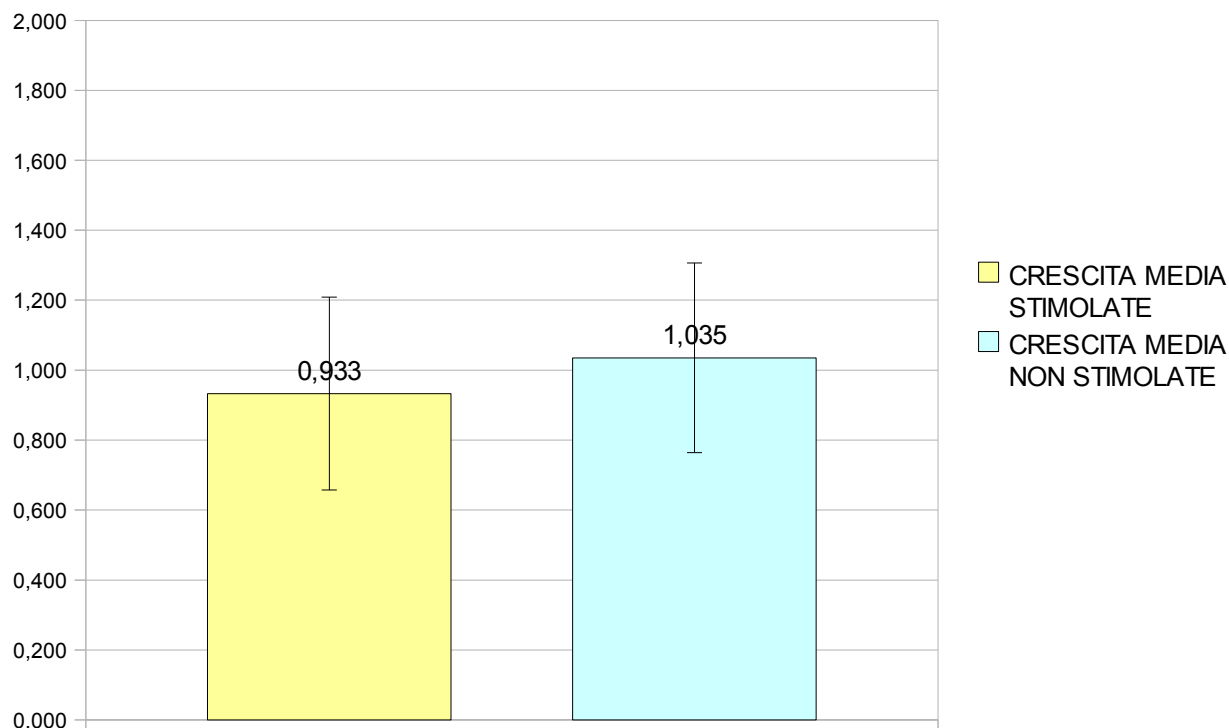
Il trattamento non ha provocato significative variazioni nel tasso di crescita delle colture trattate. Infatti, sia i campioni trattati che non trattati presentano un tasso di crescita medio molto simile. Il presente esperimento porta a concludere che stimolazioni in acuto a 40 da 10 minuti ciascuno per 3 giorni non nuocciono alla salute cellulare.

Comunque, i dati raccolti evidenziano una piccola diminuzione del valore di crescita nelle cellule trattate (0.933) rispetto a quelle non trattate (1.035), anche se si ha una variabilità molto grande (deviazione standard totale = 0.274). La lieve, ma non significativa diminuzione e' forse dovuto al fatto che vengono trattate solo per 3 giorni. Di fatti, durante la settimana di trattamento le cellule venivano piastrate sulle petri il lunedì, e poi stimolate il martedì, mercoledì e il giovedì. Le foto per il conteggio delle cellule sono state prese il lunedì e alla fine del trattamento, cioè il venerdì della settimana in questione. In effetti bisogna anche tenere conto che le osservazioni fatte si



riferiscono a un periodo molto breve di tre giorni e che risultati del genere sull'uomo si possono valutare solo dopo un paio di mesi.

**VALORI DI CRESCITA MEDIA DELLE COLTURE DI ASTROCITOMA  
STIMOLATE E NON STIMOLATE**



*Il grafico mostra come il tasso di crescita delle cellule trattate abbia un valore medio minore di quelle non trattate. La variabilità (segnata con le barre d'errore), purtroppo, supera di gran lunga la differenza tra i due tassi, rendendo la diminuzione quasi trascurabile.*

## 4 CONCLUSIONI

Dai dati raccolti sul tasso di crescita si è appurato che stimolazioni in cronico di tre giorni consecutivi con il Rexion-Age regolato a 40 per 10 minuti non sono dannose per la salute cellulare e che, quindi, non contribuiscono alla morte cellulare. Inoltre, una lieve diminuzione, anche se non significativa, nella crescita cellulare dopo solo 3 cicli di trattamenti evidenzia una possibile azione da parte del trattamento eseguito.

Si propone, perciò, di fare ulteriori indagini. In particolare, ritenendo trattamenti di soli 3 giorni troppo pochi per ottenere risultati significativi sulla crescita cellulare, si faranno studi su stimolazioni maggiormente prolungati. Infatti, si inizierà un nuovo studio su trattamenti di anche 10-15 giorni su colture di astrocitoma. Inoltre, si potrebbero eseguire le analisi sulla crescita a settimane di distanza dal trattamento stesso, per appurare eventuali effetti a lungo termine. Un risultato significativo di questi studi potrebbero confermare che le stimolazioni con il Rexion-Age sono una possibile applicazione per il trattamento dei tumori cerebrali recidivi.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. Adey WR (1990a): Electromagnetic fields and the essence of living systems. ( In Andersen CB fell): "Modern Radio Science." Oxford: University Press, pp 1-37.
2. Adey WR (1990b): Joint actions of environmental nonionizing electromagnetic fields and chemical pollution in cancer promotion. *Environ Health Perspectives* 86:297-305.
3. Adey WR (1993): Biological Effects of Electromagnetic Fields. *Journal of Cellular Biochemistry* 51:410-416 (1993) .
4. Delgado JMR, Leal J, Monteagudo JL. Garcia MG X1982): Embryological changes induced by weak. extremely low frequency electromagnetic fields. *J Anat* 134:553-551.
5. 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.
6. 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.
7. Moolenaar WH, Aerts WJ, Tertoolen LGJ, Delast SW 1986 : The epidermal growth-factor induced calcium signal in A431 cells. *J Biol Chem* 261:279-285.
8. Lerchl A, Nonaka KO, Reiter RJ (1990): Pineal gland "magnetosensitivity" is a consequence of induced electric currents (eddy currents). *J Pineal Res* 10:109-116.
9. Reiter RJ (1992): Changes in circadian melatonin synthesis in the pineal gland of animals exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: A summary of observations and speculation on their implications. In MooreEde MC, Campbell SS, Reiter R,J (eds) "Electromagnetic Fields and Circadian Rhythmicity. Boston: Birkhauser, pp 13-25.
10. Wilson BW, Anderson LE (1990): Electromagnetic field effects on the pineal gland. In Wilson BW, Stevens RG, Anderson LE (eds): "Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields: The Question of Cancer." Columbus, Ohio: Battelle Press, pp 159-186.
11. Byus CV, Lundak RL, Fletcher R31. Adey I'fR 1984) Alterations in protein kinase activity following exposure of cultured lymphocytes to modulated microwave fields *Bioelectromagnetics* 5:34-51.
12. Lyle DB, Schechter P, Adey WR, Lundak RL (1983): Supression of T lymphocyte cytotoxicity following exposure to sinusoidally amplitude-modulated fields. *Bioelectromagnetics* 4:281-292.
13. Lyle DB, Ayotte RD, Sheppard AR, Adey WR (1988): Suppression of T lymphocyte cytotoxicity following exposure to 60 Hz sinusoidal electric fields.

14. Goodman R, Henderson AS i 1988: Exposure of salivary glands to low-frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. Proc Natl :lead Sci USA 85:3928-3932.
15. Phillips JL, Haggren W, Thomas WJ, Ishida-Jones T, Adey WR (1992): Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. Biochim Biophys Acta 1132:140-144.
16. Weaver J (1992): Electroporation: A dramatic, non-thermal electric field phenomenon. Proceedings of the First World Congress on Electricity and Magnetism in Biology and Medicine, Buena Vista, Florida, p 8.
17. Mir LM, Domenge C, Belehradek M, Pron G, Poddevin B, Orlowski S, Belehradek J, Schwaab G, Luboinski B, Paoletti C (1992): Electrochemotherapy, a new antitumor treatment using local electric pulses. Proceedings of the First World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine, Buena Vista, Florida, p 19.
18. Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH (2007). "Central Nervous System Tumours" Mayo Clin Proc. 2007 Oct;82(10):1271-86.
19. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. J Comp Neurol. 513(5):532-41 PubMed ([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ pubmed/ 19226510](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19226510))
20. FEBS J. 2008 Jul;275(14):3514-26.d- Amino acids in the brain: d-serine in neurotransmission and neurodegeneration. ([http:// www. ncbi.nlm. nih. gov/ pubmed/ 18564180](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18564180)) Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN.
21. "Neurogenesis in the adult human hippocampus". NatMed. 4 (11): 1313–7. doi:10.1038/3305. PMID 9809557; Gould, E; Reeves; Fallah; Tanapat; Gross; Fuchs (1999). "Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates" (Free full text). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (9): 5263–7. doi:10.1073/pnas.96.9.5263.
22. Role of glia in synapse development ([http:// pfrieger. gmxhome. de/ work/ publications/ pfrieger\\_2002. Pdf](http://pfrieger.gmxhome.de/work/publications/pfrieger_2002.Pdf))
23. Prof. Luigi Corti, Dip. di Radioterapia Oncologica Policlinico Universitario di Padova, Ing. Gianantonio Pozzato, Telea Engeneering : "Risonanza Quantica Molecolare e le sue applicazioni cliniche".
24. Prof. Carlo Reggiani, Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana, Università degli Studi di Padova: "Comments on Vesalius and Rexonage, two applications of high frequency electrical fields, and preliminary experimental results"