



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana**

**Department of Human Anatomy and Physiology**

## **Effetti di correnti ad alta frequenza e bassa intensità: biostimolazione e rigenerazione cellulare**

**Dipartimento di Anatomia e Fisiologia, Università di Padova  
Telea Electronic Engineering Srl**

### **Introduzione**

Correnti elettriche, campi elettrici e campi elettromagnetici sono nel loro insieme una forma di energia che può avere importanti effetti biologici agendo sia sulle cellule che sulla matrice extracellulare.

Il passaggio delle correnti elettriche attraverso tessuti, oltre a generare effetti termici, è in grado di modificare la distribuzione delle cariche disposte sulle superfici delle membrane, inducendo modificazioni delle proteine delle membrane e fra queste in particolare l'apertura o la chiusura di canali ionici voltaggio dipendenti. A opportune intensità le correnti elettriche riescono a provocare la comparsa di pori (elettroporazione) nelle membrane consentendo il trasferimento di molecole di dimensioni relativamente elevate attraverso la membrana. Questi effetti diretti della corrente possono innescare successivamente importanti risposte biologiche: si pensi alla stimolazioni, con correnti a bassa frequenza, utilizzate per controllare il dolore o a quelle utilizzate per migliorare il trofismo e la prestazione muscolare.

L'apparecchiatura di biostimolazione messa a punto dalla Telea Electronic Engineering Srl genera correnti ad alta frequenza e a bassa intensità che applicate sui tessuti inducono un effetto termico molto modesto. Si tratta quindi di un approccio nuovo, diverso da quelli generalmente utilizzati e come tale di rilevante interesse. L'obiettivo delle indagini descritte nella presente relazione è una prima caratterizzazione degli effetti biologici di tali correnti.

### **Scopo**

Ci siamo proposti di indagare sperimentalmente gli effetti sui tessuti delle correnti ad alta frequenza e a bassa intensità generate dall'apparecchiatura di cui sopra. Gli effetti delle correnti sono stati studiati a tre diversi livelli: in vivo nell'animale, in vitro in coltura cellulare e in una sospensione proteica ad elevata concentrazione. In particolare ci si è proposti di verificare se l'applicazione della corrente potesse causare 1) danni cellulari capaci di innescare un processo di rigenerazione e 2) alterazioni della struttura di grandi molecole, quali ad esempio proteine.

## Sperimentazione in vivo

La sperimentazione in vivo è stata condotta su topi (previa autorizzazione del comitato etico dipartimentale) applicando una stimolazione di durata 1 minuto e di intensità pari a 2 in una scala arbitraria da 1 a 9, pari a circa 6W di potenza. Gli animali, dopo essere stati anestetizzati e depilati, sono stati stimolati tramite l'applicazione dell'elettrodo sulla parte bassa dell'addome. Altri animali non sono stati stimolati, ma utilizzati come controlli. Prelievi dei campioni di parete addominale sono stati effettuati a 1, 3 e 7 giorni dalla data della stimolazione. Ciascun prelievo comprendeva l'epidermide, il derma e la sottostante parete muscolare della zona che era stata stimolata.

Dall'osservazione e dal confronto di immagini acquisite da sezioni di campioni di topo (controllo e stimolati), non si evidenziano significative differenze strutturali imputabili al trattamento eseguito a livello della cute e del muscolo della parete addominale. Le uniche differenze di rilievo si possono individuare nel muscolo pellicciaio dove negli animali sottoposti a stimolazione è possibile individuare fibre sparse e modesti infiltrati parvicellulari. Queste immagini sono indicative di un processo rigenerativo che rappresenta la probabile evoluzione di un minimo danno indotto dalla corrente.

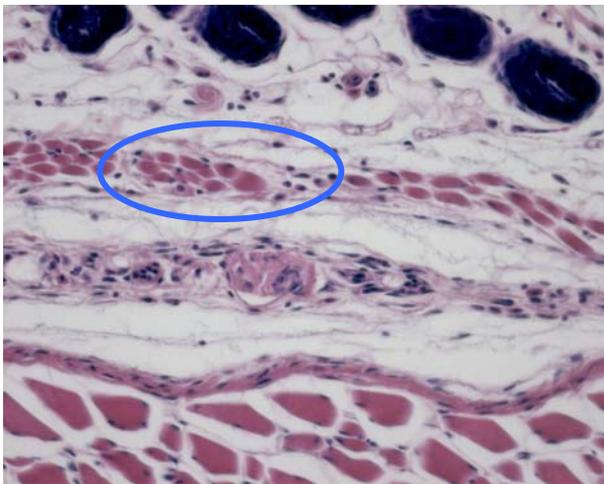


Figura 1: Nel cerchio è visibile l'infiltrato parvicellulare nel muscolo pellicciaio. Colorazione con ematossilina-eosina.

Un approccio alternativo alla rilevazione di processi degenerativi-rigenerativi muscolari innescati dalle correnti elettriche è rappresentato dalla comparsa delle isoforme della miosina tipiche delle cellule immature (miosina neonatale e embrionale). Queste proteine possono essere considerate come marcatori molecolari dei processi rigenerativi e la loro presenza in un muscolo adulto va considerata come la conseguenza di un danno cellulare, avvenuto alcuni giorni prima.

Per visualizzare la presenza di queste proteine, la stimolazione è stata effettuata con intensità 2 (circa 6W di potenza) e per 1 minuto a livello della superficie cutanea sovrastante il muscolo tibiale anteriore nell'arto posteriore del topo. Il muscolo dell'arto controlaterale, non stimolato, è stato usato come controllo con il quale effettuare il confronto. I prelievi sono stati realizzati ad 1, 3 e 7 giorni dalla stimolazione. L'esame elettroforetico delle proteine non ha evidenziato la comparsa di bande riferibili alle miosine neonatali e embrionali, né la presenza di uno smear attribuibile a diffusa proteolisi.

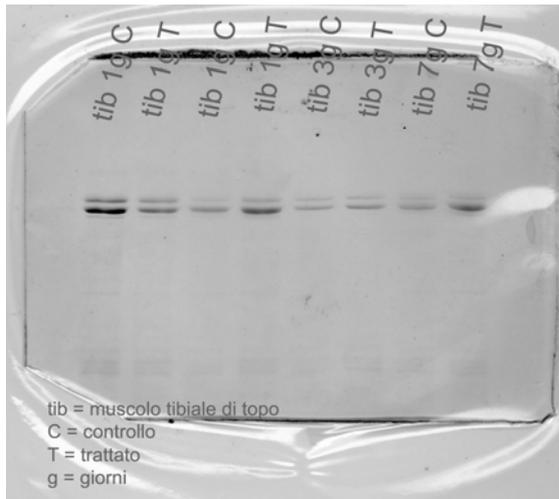


Figura 2: Elettroforesi su gel di poliacrilamide che mette in evidenza le isoforme della miosina (peso molecolare 200 kD)

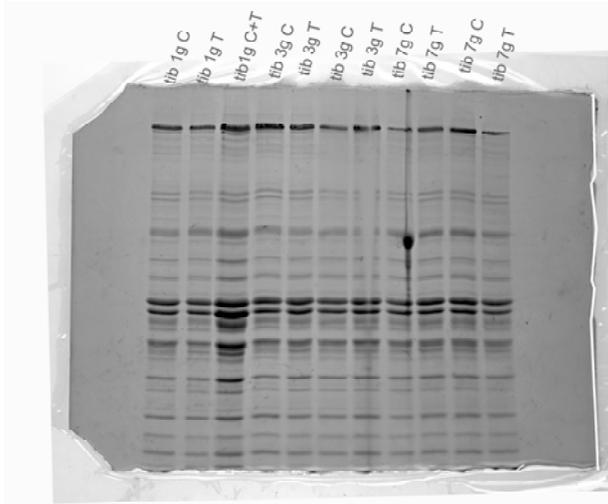


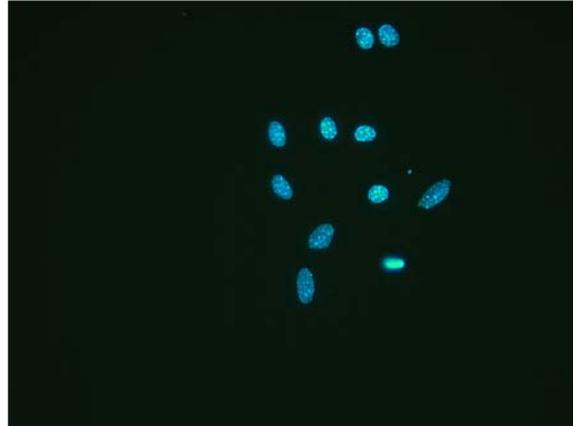
Figura 3 Elettroforesi su gel di poliacrilamide che mette in evidenza tutte le principali proteine di peso molecolare superiore a 10kD

### Sperimentazione in vitro su colture cellulari:

Il possibile effetto di induzione di apoptosi e morte cellulare e' stato verificato su colture di mioblasti e fibroblasti. Le colture primarie sono state ottenute da muscoli dell'arto posteriore di topi neonati. La stimolazione con correnti ad alta frequenza è stata effettuata sulle colture a circa 5 giorni dal piastramento delle cellule, prima che la coltura giungesse a confluenza. La stimolazione ha considerato differenti parametri di durata e di intensità. Le colture così stimolate sono state fissate a 2 ore , 1 giorno e 2 giorni dalla stimolazione. Dopo la fissazione, le colture sono state colorate con il colorante nucleare Hoechst. La morfologia dei nuclei delle cellule è stata osservata utilizzando un microscopio a fluorescenza (alla lunghezza d'onda 350 nm). In queste condizioni i nuclei apoptotici possono essere identificati dalla cromatina condensata che si raccoglie alla periferia della membrana nucleare o da una morfologia totalmente spezzettata delle strutture nucleari, mentre si considerano normali i nuclei che emettono luce intensa e omogenea.

In nessun caso si sono osservati segni di apoptosi. Questo suggerisce che la applicazione delle correnti ad alta frequenza non ha effetti lesivi sulle cellule (mioblasti e fibroblasti) messi in coltura

Figura 4: Gruppo di nuclei colorati con Hoechst. Si può notare l'aspetto regolare.



## Sperimentazione su proteine in soluzioni

L'azione delle correnti ad alta frequenza è stata studiata su una soluzione di Albumina alla concentrazione di 0,5%. La corrente è stata applicata sperimentando intensità variabili da 1 a 8 su una scala convenzionale 1-9 (praticamente da potenza 0W fino a potenza di circa 15W) e durata variabile da 1 a 7 minuti, valori più elevati di quelle utilizzati su tessuti e cellule in vivo e in vitro. La composizione della soluzione proteica è stata esaminata con gel elettroforesi e non si è osservato in nessun caso segni di degradazione della proteina.

## Conclusione

Considerate nel loro insieme le indagini sperimentali condotte:

- 1) permettono di escludere che la applicazione delle correnti ad alta frequenza nell'ambito delle intensità e e delle durate studiate possa causare alterazioni dirette della struttura proteica (vedi esperimenti con soluzioni di albumina), possa innescare fenomeni apoptotici (vedi esperimenti sulle colture cellulari) e possa causare importanti fenomeni di degenerazione-rigenerazione a livello tissutale (vedi esperimenti sulle isoforme della miosina nel tibiale anteriore).
- 2) evidenziano, mediante l'analisi istologica, la comparsa nel muscolo pellicciaio dell'addome degli animali stimolati di infiltrati parvicellulari di modeste dimensioni e di disorganizzazione strutturale che suggeriscono la possibilità di fenomeni di risposta a processi degenerativi localizzati. Tali fenomeni non sono stati osservati né nei muscoli retti della parete addominale, né nel muscolo tibiale anteriore.

La presenza di fenomeni degenerativi-rigenerativi nei muscoli più superficiali richiede un commento. Questi fenomeni degenerativi-rigenerativi che si sovrappongono al normale ricambio cellulare del muscolo e non ne sconvolgono, per la loro modesta entità, la struttura, potrebbero rappresentare un importante meccanismo di rinnovamento tissutale innescato dalla stimolazione con correnti a bassa intensità ed alta frequenza. Ulteriori studi dovrebbero essere indirizzati a chiarire:

- 1) se simili fenomeni si verificano anche nei tessuti connettivali
- 2) quale è il meccanismo determinante la degenerazione-rigenerazione cellulare.

Professor Carlo Reggiani  
Responsabile Scientifico della Ricerca

Padova 4 aprile 2005