



# REGENOTERAPIA

## *ISTOLOGIA*

Istologo: Prof. G. Papaccio  
la sua Equipe  
Università: Federico II - Napoli



Seconda Università degli Studi di Napoli

Azienda Universitaria Policlinico

Dipartimento di Scienze Medico-Legali

Ambulatorio di

Elettromiografia Clinica applicata alla Medicina Preventiva e Legale

Responsabile: Prof. Bartolomeo Valentino

Sede: Istituto di Anatomia - via L. Armanni 5 - 80138 Napoli - tel. 081.297659 - fax 081.5666010

Napoli, 21 novembre 2001

**EFFETTI DELLE RADIOFREQUENZE MODULATE E SERIALI SULLA CRESCITA DEGLI OSTEOCITI E DELLE CELLULE EPITELIALI: UNO STUDIO IMMUNOCITOCHIMICO.**

Prof. Gianpaolo Papaccio II Università di Napoli – Cattedra di Istologia.

**ESTRATTO**

Questo studio è stato effettuato su ratti sottoposti a radiofrequenze mediante l'uso dell'apparecchio denominato *Regenomed*. I risultati hanno dimostrato che i ratti trattati presentavano un incremento della proliferazione cellulare, significativamente maggiore rispetto ai ratti non trattati. Questo si è evidenziato sia per gli osteociti che per le cellule epiteliali. Il sistema sembra essere decisamente interessante proprio per gli effetti a carico della proliferazione cellulare, che si intendono verificare con questo lavoro.

**INTRODUZIONE**

Negli anni passati una nuova tecnica, basata sull'uso di radiofrequenze, è stata sviluppata ed impiegata in molte patologie ricostruttive dei tessuti. Nonostante i risultati clinici siano statati eccellenti, ad oggi, non è ancora noto il ruolo che queste radiofrequenze svolgono sullo sviluppo cellulare.

Le applicazioni di tale terapia nelle patologie odontoiatriche ed in riabilitazione sono stata impiegate per la capacità di ottenere effetti rigenerativi. Ci è stato pertanto richiesto di verificare gli effetti di queste radiofrequenze sui tessuti e sull'accrescimento cellulare.

E' noto che le cellule epidermiche, e particolarmente quelle pilifere, mostrano un elevato potere di accrescimento, mentre gli osteociti hanno uno scarso potere di accrescimento e rigenerazione. Per questo motivo abbiamo puntato la nostra attenzione su questi due citotipi, per meglio comprendere la capacità di queste radiofrequenze di attivare la proliferazione cellulare.

Abbiamo cominciato gli studi usando ratti Wistar. Ad oggi abbiamo osservato che la Regenoterapia, che si basa sull'uso di radiofrequenze modulate e seriali, è capace di stimolare significativamente l'accrescimento e la proliferazione cellulare sia delle cellule epidermiche che degli osteociti.

## **MATERIALI E METODI**

Animali: Ratti adulti Wistar, di entrambi i sessi, del peso di circa g 400 e 450 ciascuno, con libero accesso ad acqua e cibo sono stati mantenuti presso i laboratori della Seconda Università di Napoli.

### Procedura sperimentale:

Le cavie appartenenti al campione di controllo (gruppo 1) e quelle trattate (gruppo 2), furono sottoposte due ore prima di un intervento chirurgico alla iniezione intraperitoneale di un agente marcante per la valutazione della proliferazione cellulare (anti-5-bromo-2'-desossiridico/anticorpo nucleare monoclonale, RPN 20, prodotto dalla Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK). Successivamente, le cavie, sotto anestesia, sono state soggette alla asportazione di 0,5 centimetri quadrati di tessuto epidermico dorsale e di 0,1 centimetri quadrati di tessuto osseo dalla mascella destra. L'asportazione chirurgica fu fatta su ciascuna delle diverse cavie.

Dopo l'intervento chirurgico, ciascuna cavia fu messa in una singola gabbia. I ratti del secondo gruppo (quelli trattati) furono sottoposti a regenoterapia, mediante l'uso dell'apparecchio *Regenomed*, che emette radiofrequenze da 1 MHz ad oltre 400 MHz. Ciascuna gabbia fu coperta con un'antenna fabbricata appositamente. L'esposizione alla regenoterapia fu programmata per 20 minuti al giorno per 20 giorni di trattamento. Alla fine le cavie furono lasciate per 10 giorni senza esposizione alle radiofrequenze, prima di essere sacrificate insieme alle cavie del gruppo di controllo che non erano state sottoposte a regenoterapia.

Quando le cavie furono sacrificate da ciascuna fu asportato 1 cm quadrato di tessuto mediante un'incisione praticata sullo stesso punto dell'intervento chirurgico ed il tessuto fu immediatamente fissato nel liquido di Bouin ed imbibito di paraffina.

Immunocitochimica ex-vivo: Osservazioni immunocitochimiche furono fatte *ex-vivo* sulla sostanza pancreatica presa dalle cavie. Con l'RPN 20 furono marcate le cellule poiché questi è un analogo della tiroxina e viene pertanto usato per marcare le cellule che si sono riprodotte durante il periodo di incubazione. Due ore prima del sacrificio fu iniettato nei ratti trattati RPN 20. Dopo la morte i tessuti vennero asportati e fissati in una soluzione al 4% di paraformaldeide. Poi furono quantificati il numero dei nuclei immunostatinici.

Misurazione della proliferazione cellulare: La proliferazione cellulare è stata valutata mediante il saggio MTT 3-(4,5-dimetiltiazolo)2-5-difenil-2H-tetrazolo-bromuro. Le cellule sono state coltivate su substrato gelatinoso in piastre contaglobuli ad una densità di 1000 cellule/cella. Le cellule furono allevate in RPMI 1640 contenente 20% FCS più 100 microgrammi/ml ECGS (Sigma, Milano, Italia). Dopo 1,3,5,7, giorni di coltura le cellule sono state incubate con la soluzione MTT (0.5% 50 microlitri/cella) per 4 ore. Durante questo periodo di incubazione le formazioni insolubili in acqua si complessano con la sostanza colorante. Successivamente si solubilizza e si quantificano le cellule colorate mediante l'uso dello spettrofotometro (ELISA) a 570 nm. L'assorbanza è direttamente correlata al numero di cellule. I risultati sono stati espressi in densità ottica a 570nm. Il grado di proliferazione cellulare è stato comparato con quello delle cellule non trattate.

#### Valutazione statistica:

I dati sono stati computati come significativi valutando la Deviazione Standard e analizzandoli mediante la *t* di Student.

## **RISULTATI**

Capacità di proliferazione cellulare: La quantità di proliferazione cellulare delle cellule epidermiche e degli osteociti fu stimata mediante il metodo ELISA, osservando un significativo incremento della proliferazione cellulare. L'analisi MTT rivelava che le cellule epiteliali mostravano una capacità di proliferazione più elevata rispetto agli osteociti ( $p < 0,01$ ) così come rispetto al controllo ( $p < 0,001$ ); d'altra parte anche gli osteociti presentano una maggiore proliferazione rispetto al controllo ( $p < 0,001$ ). I risultati hanno anche dimostrato che gli osteociti delle cavie non trattate mostravano una proliferazione completamente assente e quelle epiteliali una proliferazione significativamente meno intensa.

## DISCUSSIONE

Il presente studio è stato compiuto per valutare le capacità terapeutiche di una nuova tecnica basata sull'uso di radiofrequenze.

Il ruolo e l'efficacia di questa terapia sull'accrescimento cellulare è ad oggi sconosciuto.

L'apparecchio denominato *Regenomed* è già disponibile ed applicazioni vengono effettuate in odontoiatria ed nella riabilitazione ed essa viene presentata come una terapia rigenerativa.

D'altra parte noi conosciamo bene l'elevata capacità di accrescimento delle cellule epiteliali e quella invece scarsa delle cellule ossee (osteociti). Per questo il compito del presente studio è stato finalizzato all'analisi della stimolazione all'accrescimento di entrambi i tipi di cellule, per capire come le radiofrequenze possono influire sullo sviluppo cellulare.

Lo studio è stato effettuato con l'impiego di ratti Wistar.

I tessuti oggetto del nostro studio sono stati:

- il tessuto osseo
- il tessuto epiteliale
- il tessuto muscolare.

### **Tessuto osseo** (gonion della mandibola)

E' stata evidente la positività di alcuni osteociti alla desossiuridina. Inoltre si è evidenziata una positività marcata delle cellule endostali dei canali haversiani, nonché delle cellule dello strato cambiale del periostio, progenitori di osteoblasti, e quindi di osteociti.

E' il caso di ricordare che gli osteociti sono cellule stabili con una vita media di 29 anni. Pertanto il risultato appare molto significativo

Nel gruppo di ratti-controllo, senza applicazioni di Regenoterapia, la bromodesossiuridina ha evidenziato una risposta alla proliferazione molto scarsa.

## **Tessuto epiteliale**

Nel gruppo di ratti trattati con la Regenoterapia, si è avuta una intensa proliferazione delle cellule dello strato basale dell'epidermide e di quelle della matrice di peli. Negativa, invece, la risposta nel gruppo controllo.

## **Tessuto muscolare**

Intensa è stata la colorazione di fibrocellule muscolari (muscoli del labbro superiore) alla verifica con Bromodesossiridina. Negativa la risposta nel gruppo controllo

I risultati hanno chiaramente dimostrato che la regenoterapia, che si basa sull'emissione di radiofrequenze seriali e modulate è capace di stimolare significativamente l'accrescimento e la proliferazione delle cellule epiteliali e degli osteociti. In particolare, la proliferazione delle cellule epiteliali è stata trovata molto più elevata rispetto alle cellule non trattate. Completamente differente è il caso degli osteociti che solitamente presentano un basso livello di rigenerazione, infatti esse sono considerate cellule stabili con una vita media di 29 anni.

I nostri risultati, sorprendentemente dimostrano che anche gli osteociti mostrano un significativo incremento della capacità di rigenerazione.

Questi primi risultati ci incoraggiano a continuare le ricerche per approfondire le conoscenze sulle capacità ed i limiti di questa terapia, e valutarne i benefici.

Prof. Gianpaolo Papaccio



**SECONDO ATENEIO DI NAPOLI  
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE  
ISTOLOGIA ED EMBRIOLOGIA**

via Luciano Armanni, 5 – 80138 NAPOLI  
Tel. # 081-5666014\15 Fax # 081-5666014  
E-mail: [gianpaolo.papaccio@unina2.it](mailto:gianpaolo.papaccio@unina2.it)

*Prof. Gianpaolo Papaccio  
Professore di ruolo di Istologia*

Napoli li 8 Aprile 2002

Oggetto: ricerca in corso su ratti sottoposti a regenoterapia.

Dalle ricerche, ancora in corso, si è evidenziato chiaramente sinora che la regenoterapia non ha alcun effetto di tipo secondario su altri organi non selezionati per la preventiva "ingiuria" chirurgica.

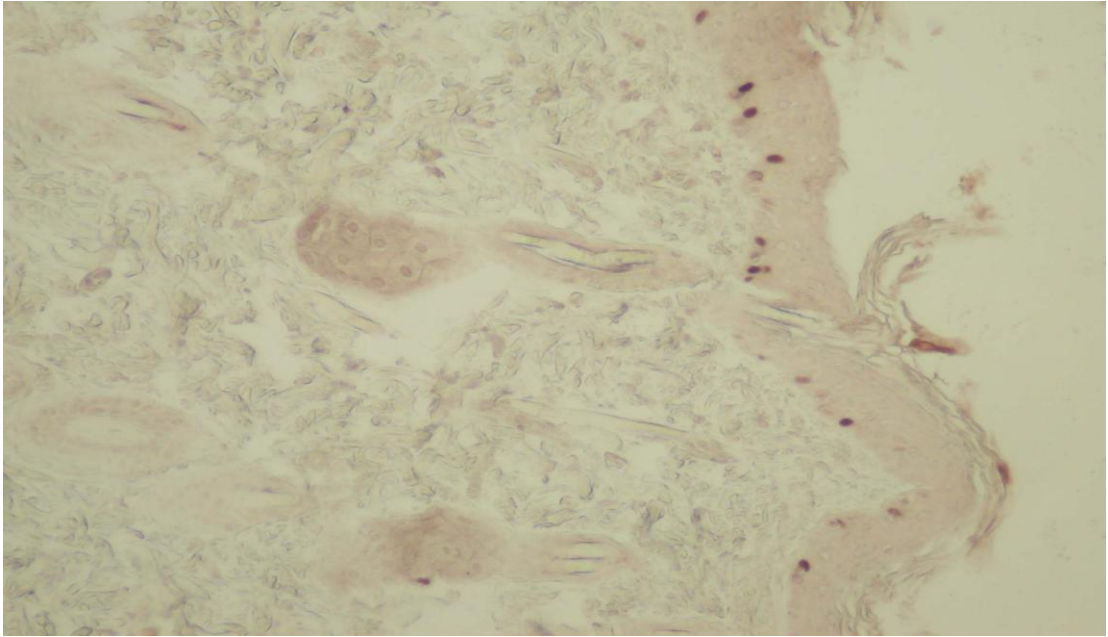
In particolare i testicoli di ratti maschi sono risultati perfettamente nella norma ed assolutamente integri così come i controlli.

Nessun effetto è pertanto stato osservato sulle gonadi né sugli elementi delle linea germinativa di tali animali.

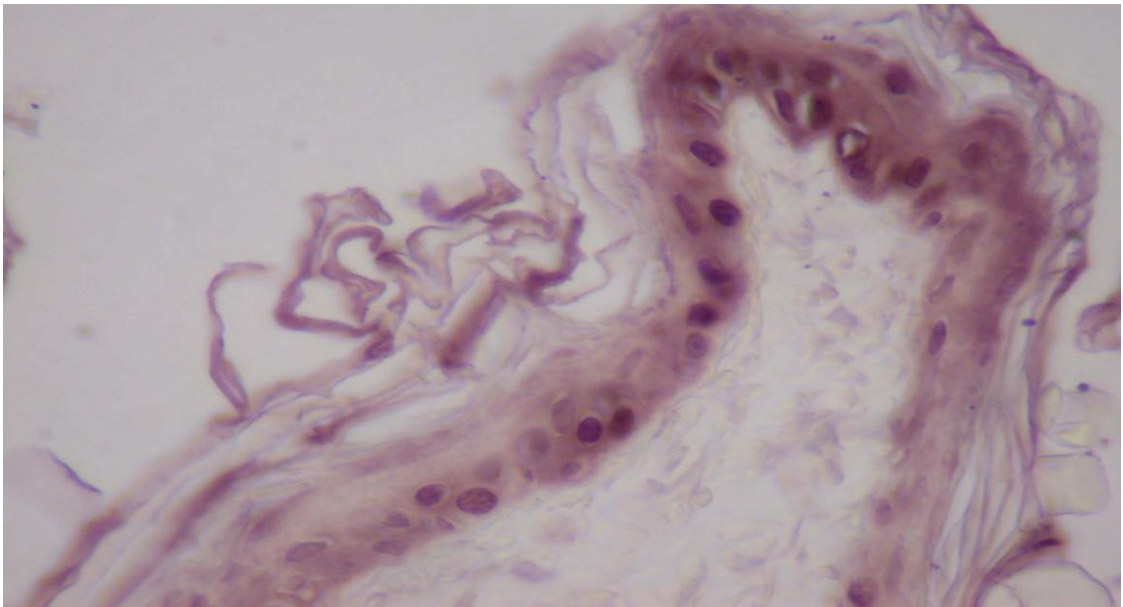
In fede

Prof. Gianpaolo Papaccio

Controllo 4 gg. Labbro superiore: in ratti non sottoposti alla Regenoterapia, ma solo al controllo con la Bromodesossiuridina; visibili poche cellule dello strato basale dell'epidermide.

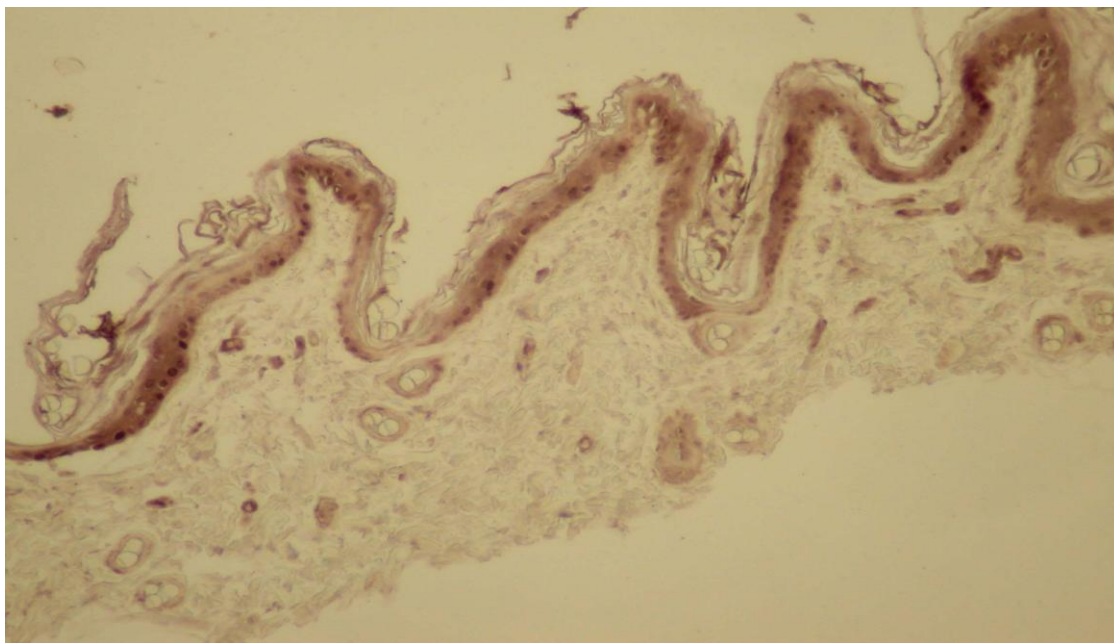


Epidermide dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. (ingrandimento -40x): stesse considerazioni della diapositiva n.3, ma con maggiore ingrandimento ottico.

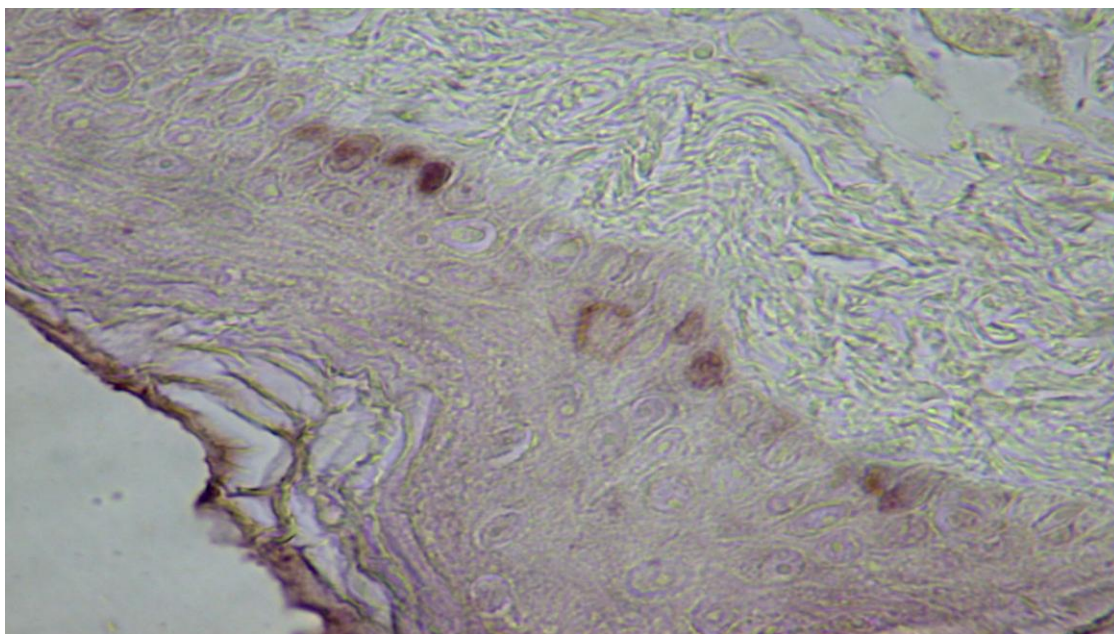




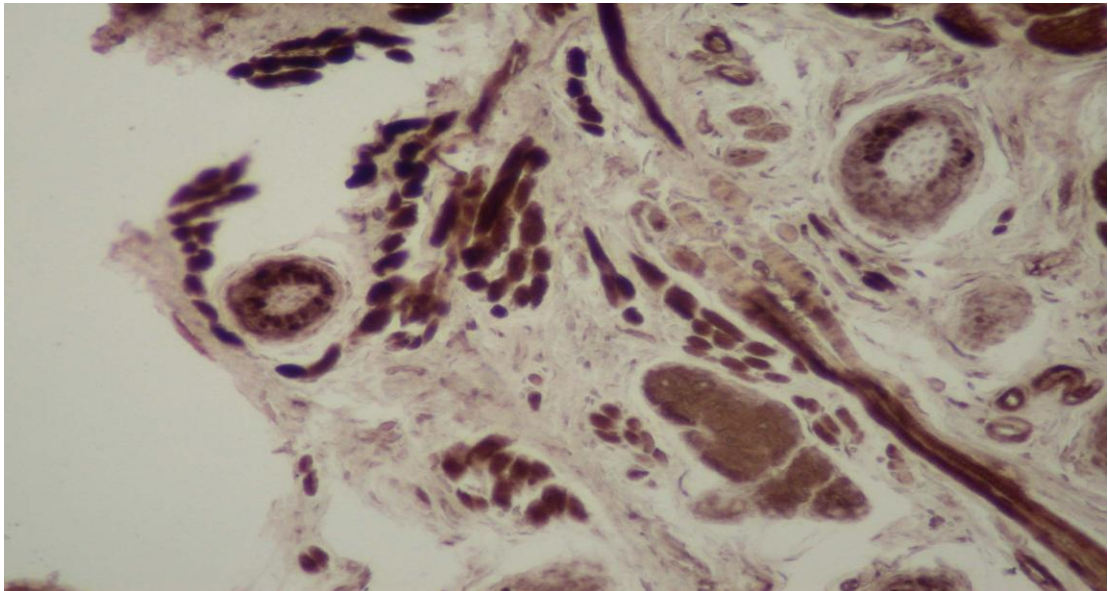
Epidermide dopo 4 giorni: si evidenzia una intensa colorazione dello strato basale dell'epidermide (labbro superiore) in ratti trattati per 4 giorni (una applicazione die) con Regenoterapia.



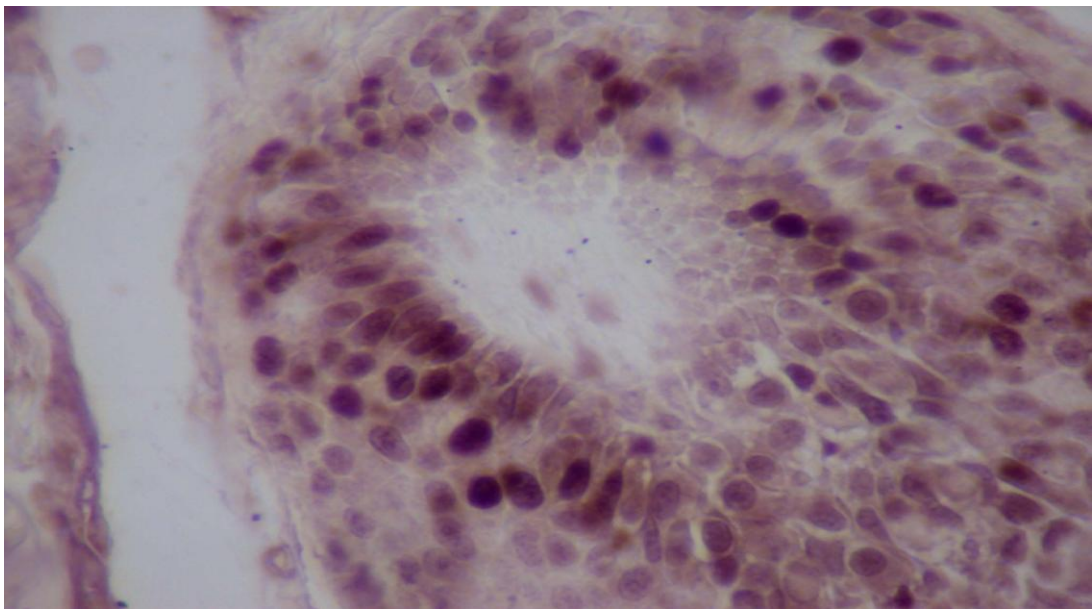
Epidermide controllo n 6: stessa valutazione della diapositiva n.2, maggiormente ingrandita.



Labbro superiore, peli e muscoli: si evidenzia una maggiore colorazione di cellule della matrice del bulbo pilifero e di fibrocellule muscolari. Quattro applicazioni di Regenoterapia.

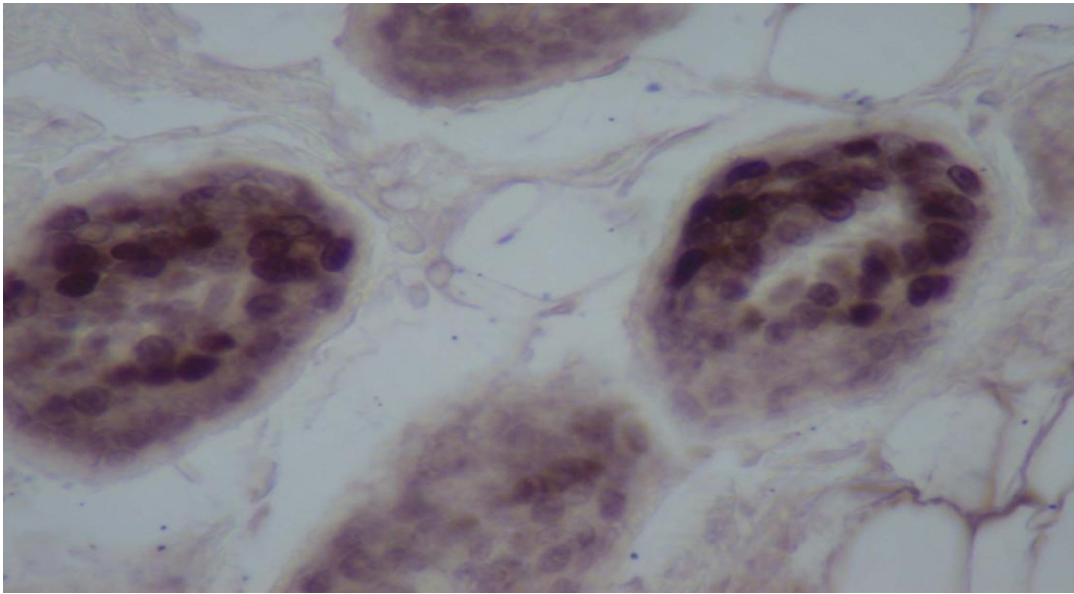


Matrice pelo labbro superiore: sezione di matrice del pelo labbro superiore, dove si riscontra intensa proliferazione cellulare dopo 4 applicazioni (una al giorno) di Regenoterapia.



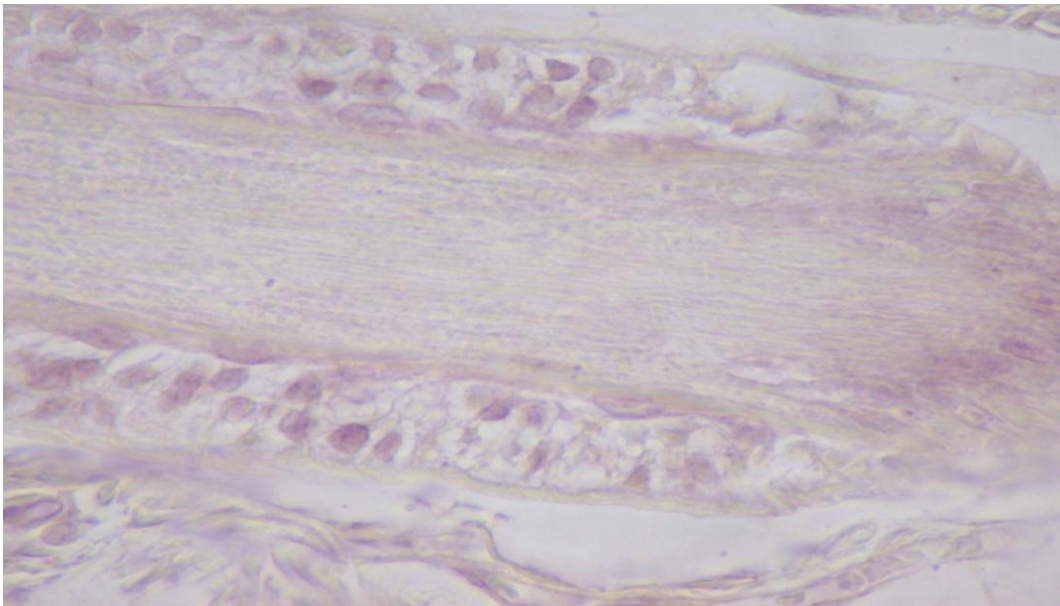
PELI LABBRO SUP fig 2

Evidente proliferazione cellulare alla base del bulbo pilifero. N. 4 applicazioni di Regenoterapia (una al giorno).



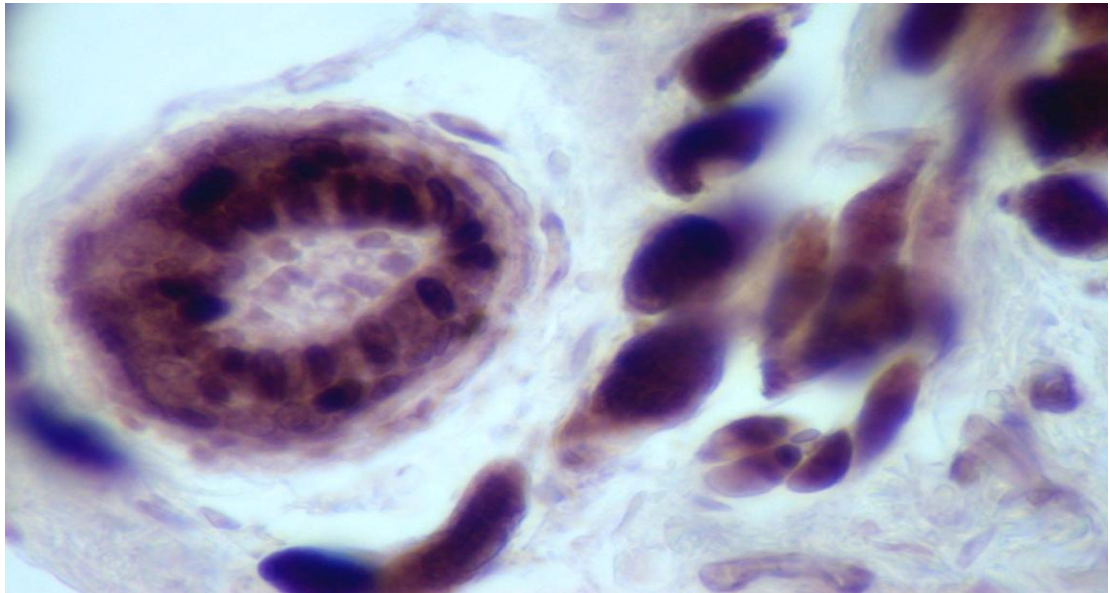
PELO EPIDERMIDE CONTROLLO n 3

Sezione longitudinale di pelo, con debole evidenza di reazione alla bromodesossiuridina, con mancanza di applicazione regenoterapica.



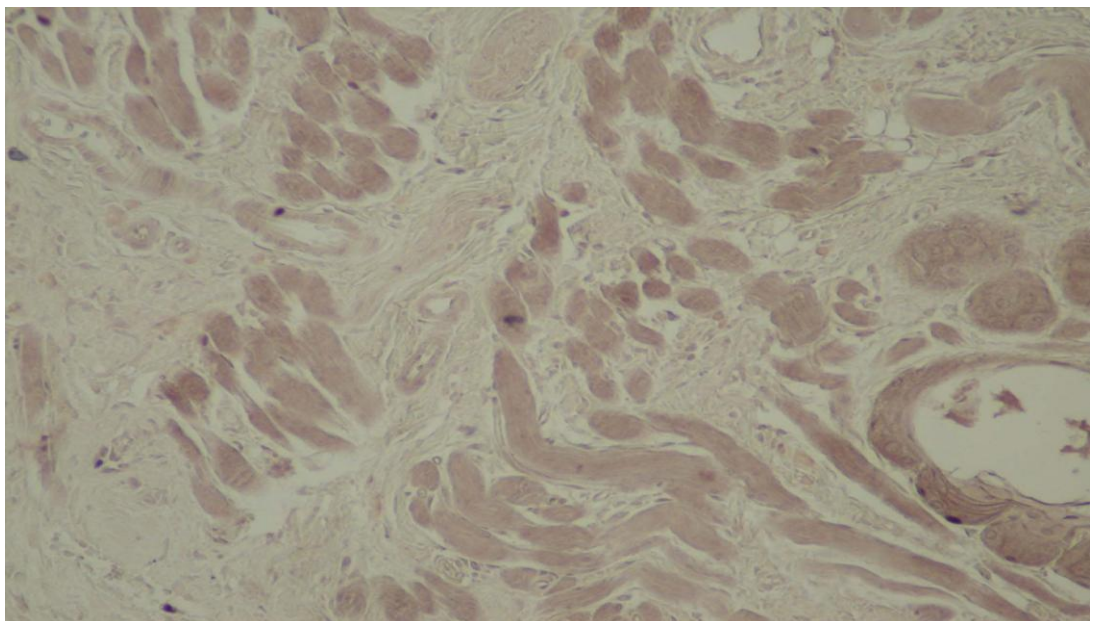
## PELO LABBRO SUPERIORE

Evidente risalto della proliferazione cellulare, nell'ingrandimento fotografico della sezione del bulbo pilifero del labbro superiore. Dopo 4 applicazioni di Regenoterapia.



Muscolatura controllo 4 gg

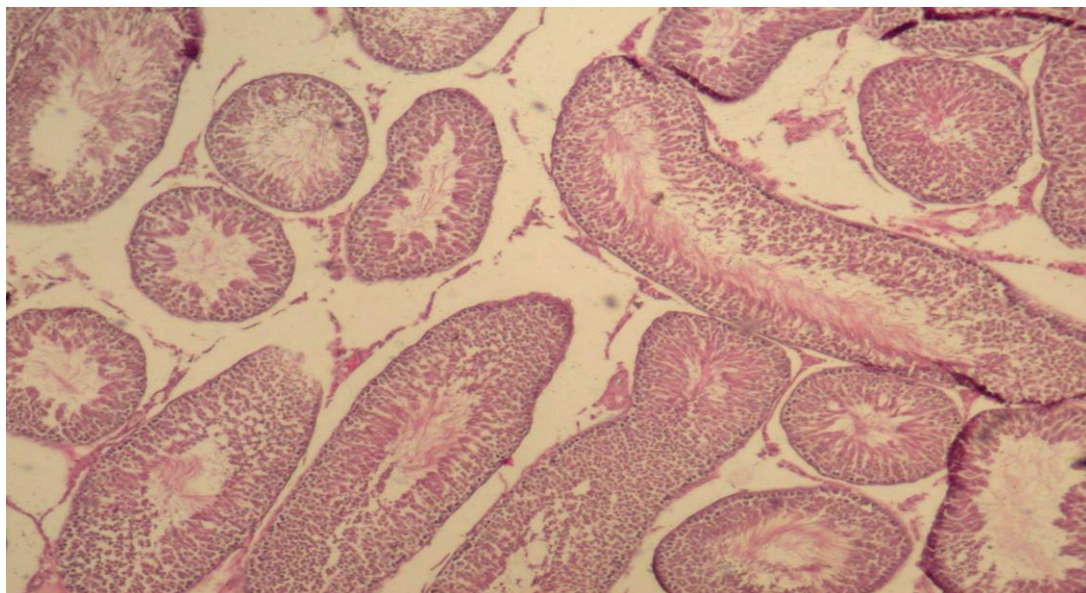
Debole risalto cromatico alla reazione con la bromodesossiuridina; risultanza ottenuta senza l'applicazione della Regenoterapia.



### TESTICOLO NON TRATTATO

Tuboli seminiferi di testicolo di ratto non trattato con Regenoterapia.

Risultato: normale quadro istologico.



### TESTICOLO DOPO 30 GIORNI DI REGENOTERAPIA

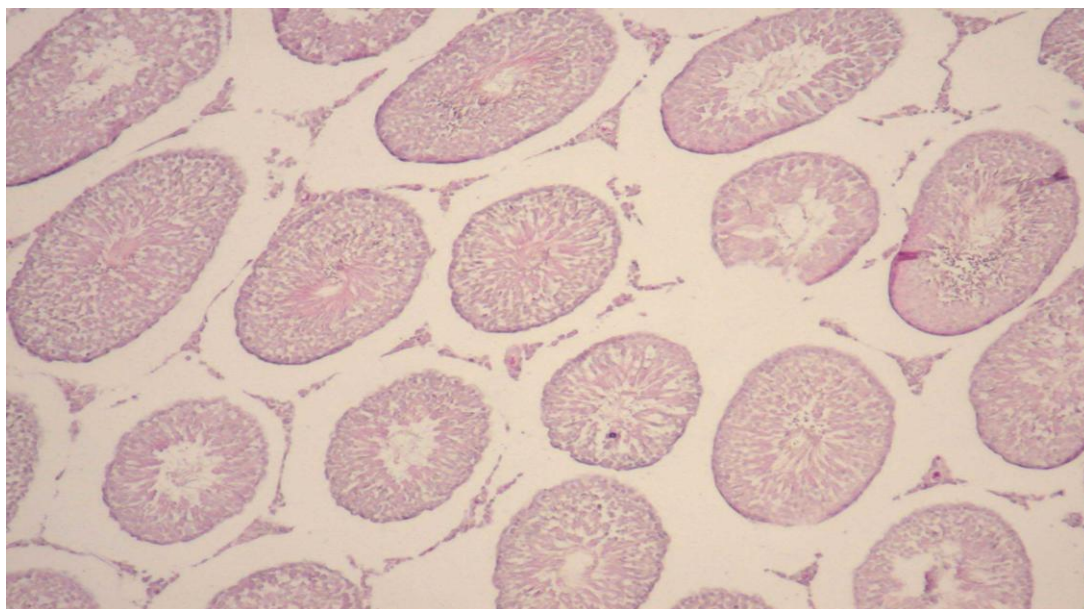
Tuboli seminiferi di ratto dopo 30 applicazioni (una al giorno) di Regenoterapia.

Risultato: quadro istologico normale.



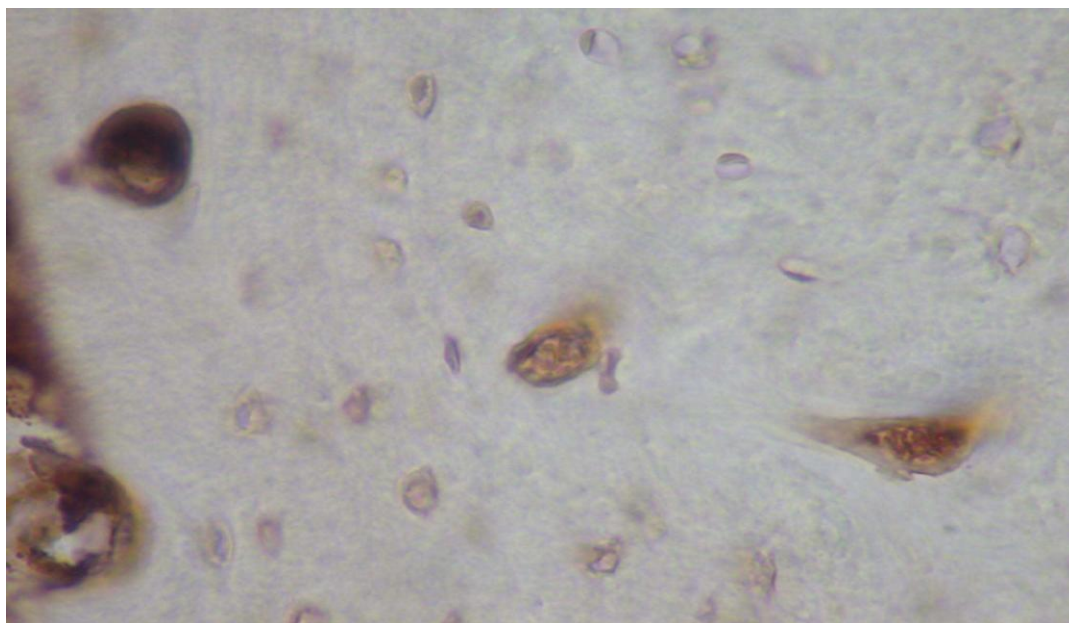
## TESTICOLO DOPO 30 GIORNI DI REGENOTERAPIA

Stesse considerazioni del vetrino n. 13.



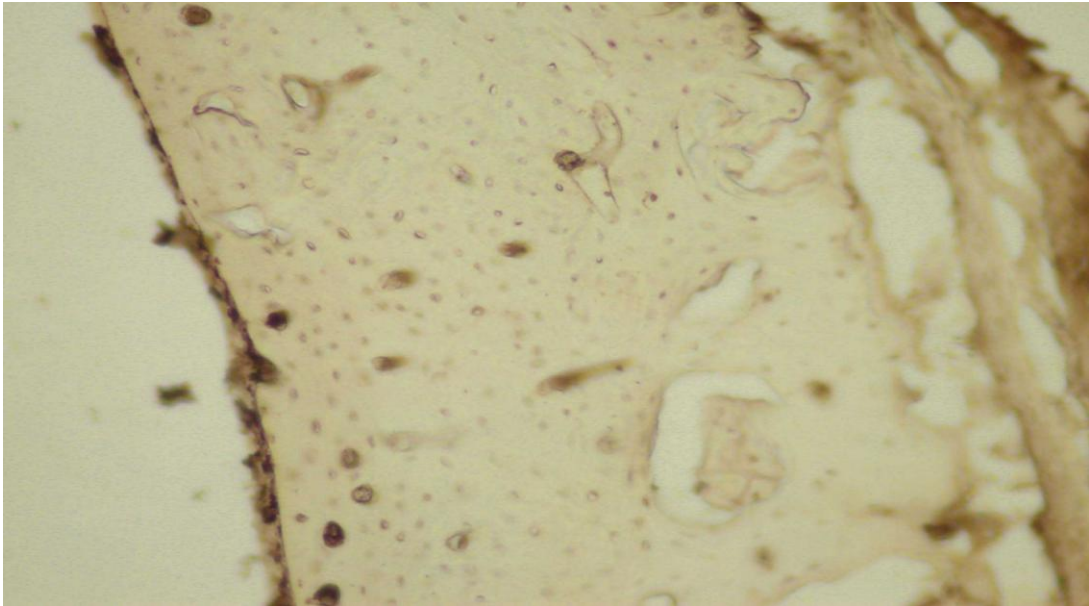
Osso dopo applicazioni 4 di Regeneroterapia. Immagine 1 JPG

Visibili osteoni, molto grandi ed altri piú piccoli, con nuclei di osteociti ben evidenziati dalla reazione con cromodesossiridina dopo trattamento regeneroterapico.

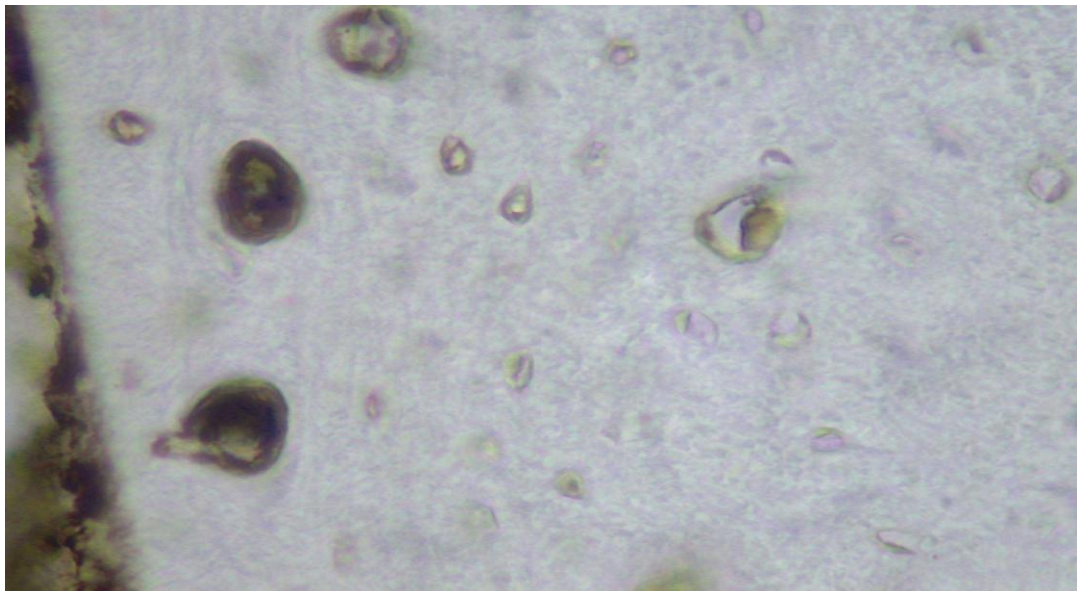


Osso dopo 4 giorni (una applicazione die). Immagina n. 3

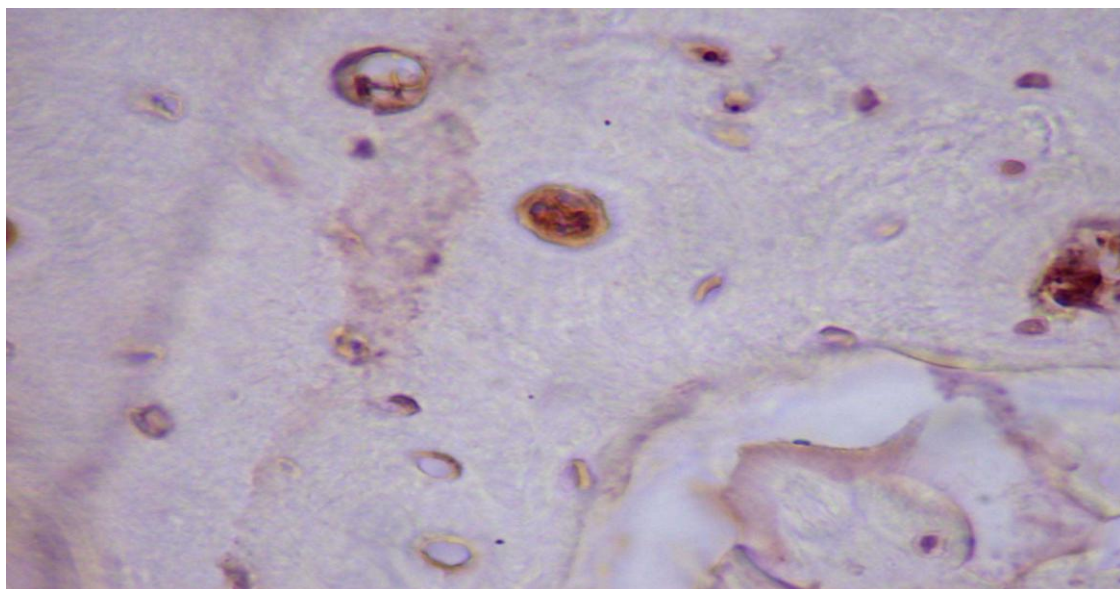
Visibili numerosi osteoni con nuclei di cellule endostali. Alcuni canali di Havers sono tagliati in senso longitudinale. Presenza di periostio, a sinistra dell'immagine, con nuclei delle cellule dello strato cambiale (progenitori degli osteociti), risultanti intensamente colorati.



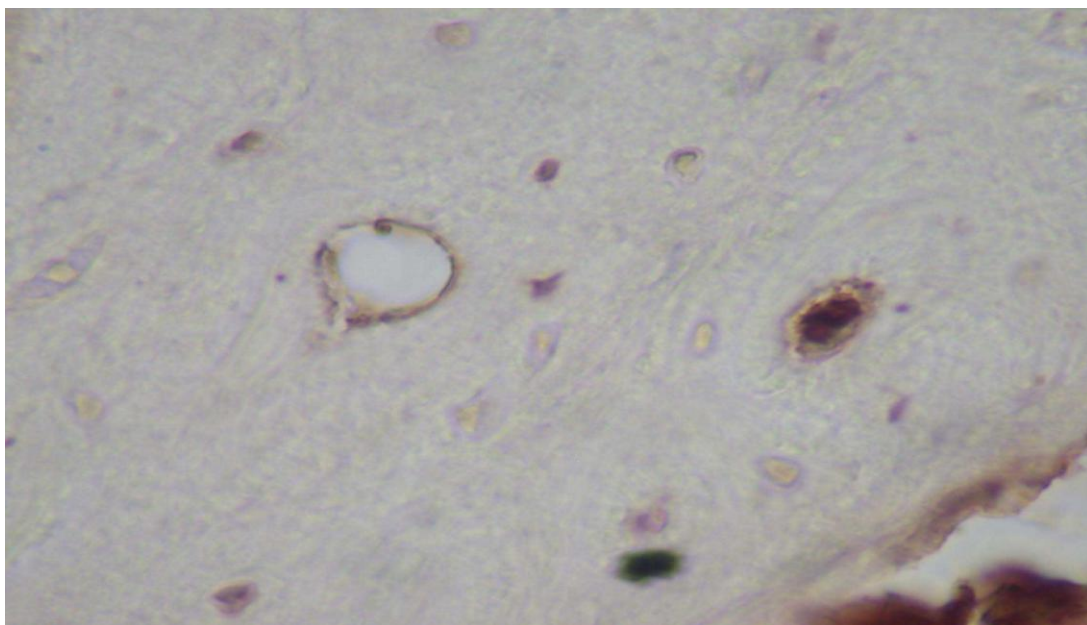
Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n. 5  
Stesse considerazioni dell'immagine n. 1.



Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n 6

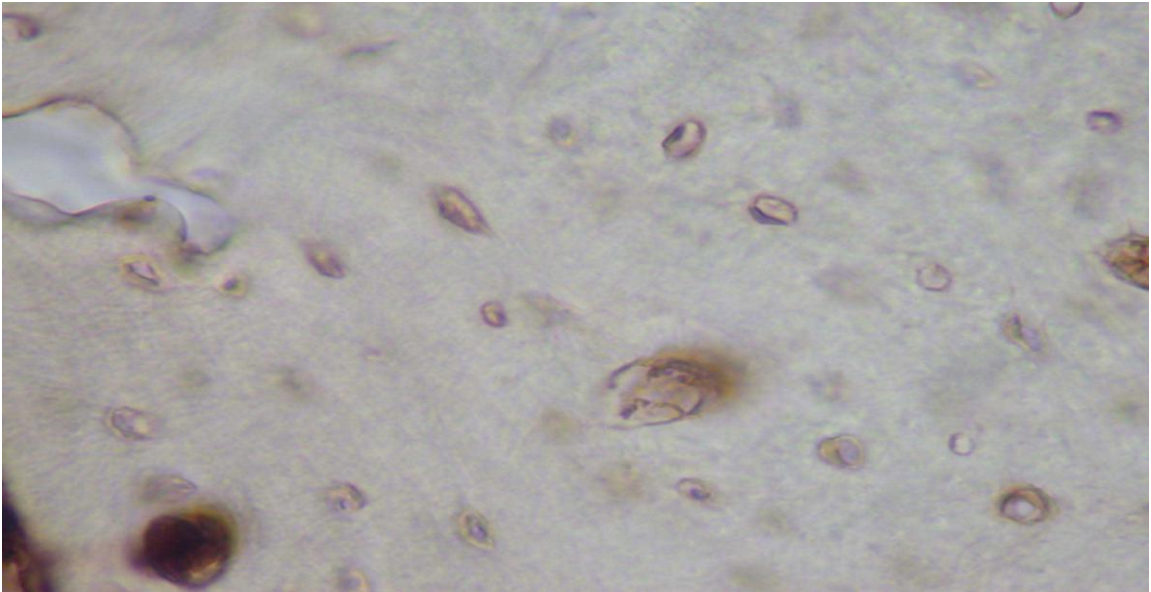


Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n 8.

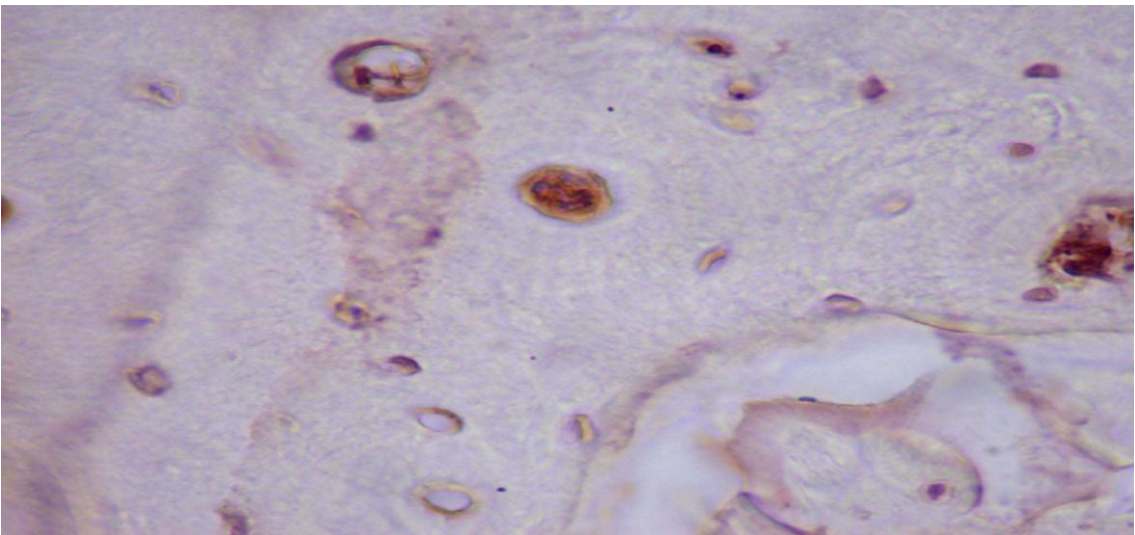




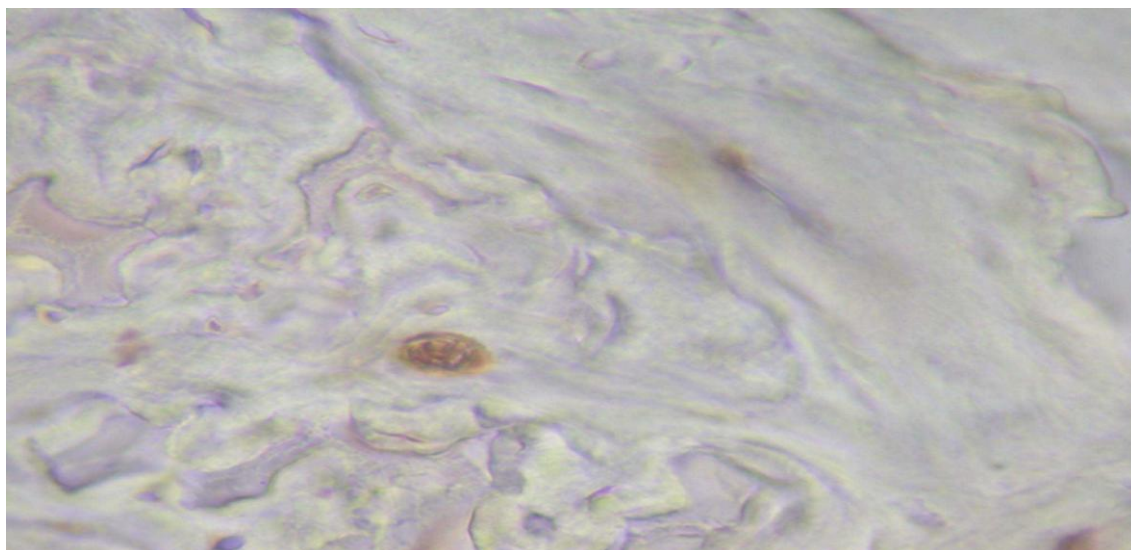
Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n 2  
JPG. Stessi riferimenti dell'immagine n.1.



Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n. 7.  
Visibili quattro grandi canali harvesiani, con cellule endostali e molti  
canali piú piccoli, con intensa colorazione degli osteociti.

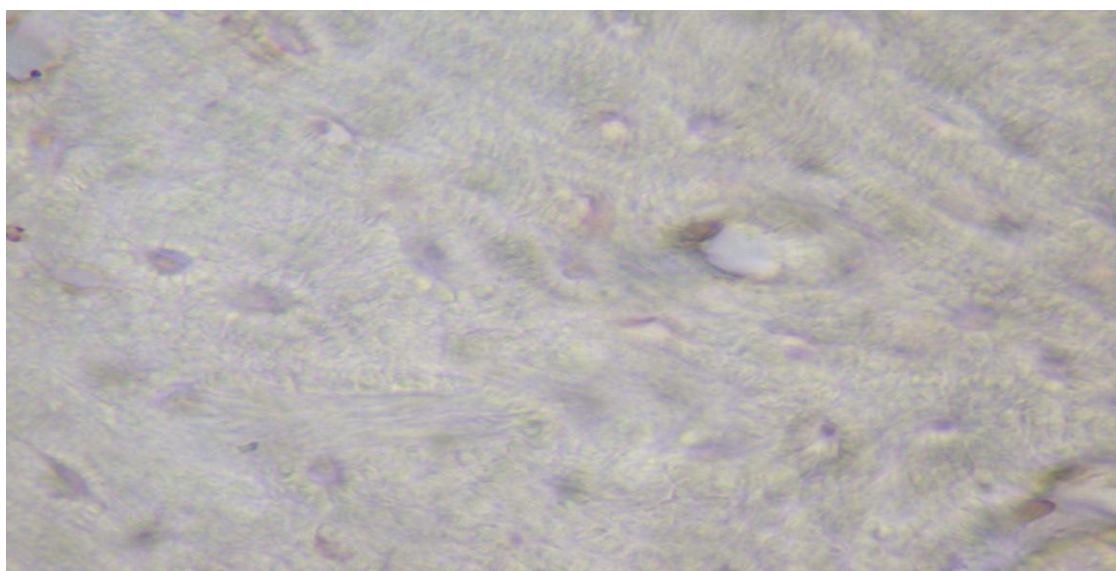


Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n 9.

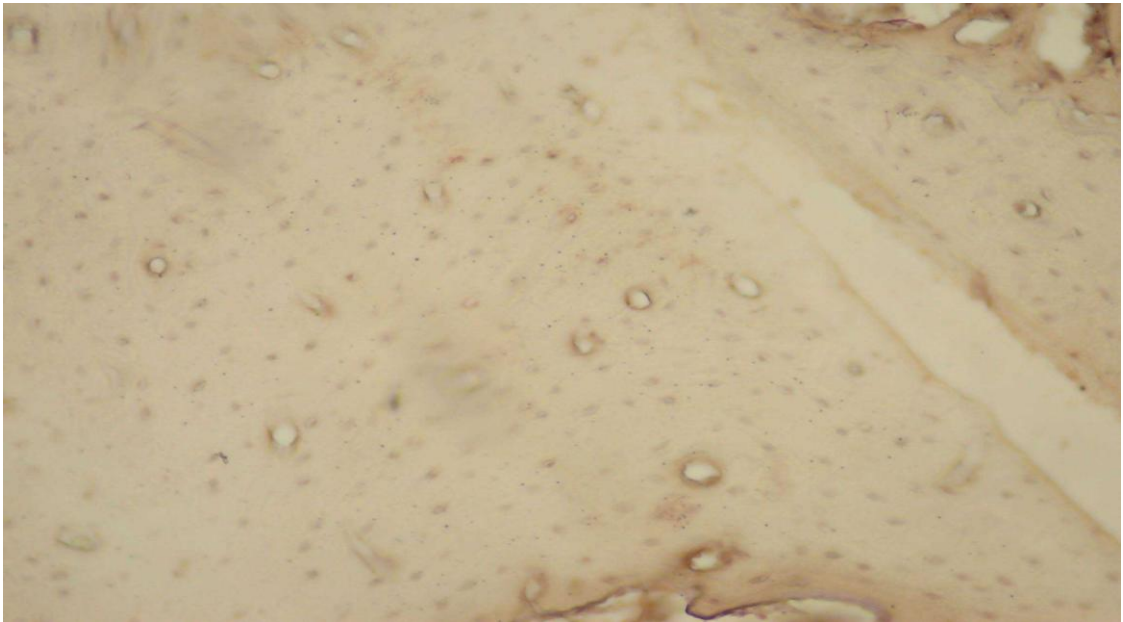


Osso dopo 4 giorni. Controllo n 1.

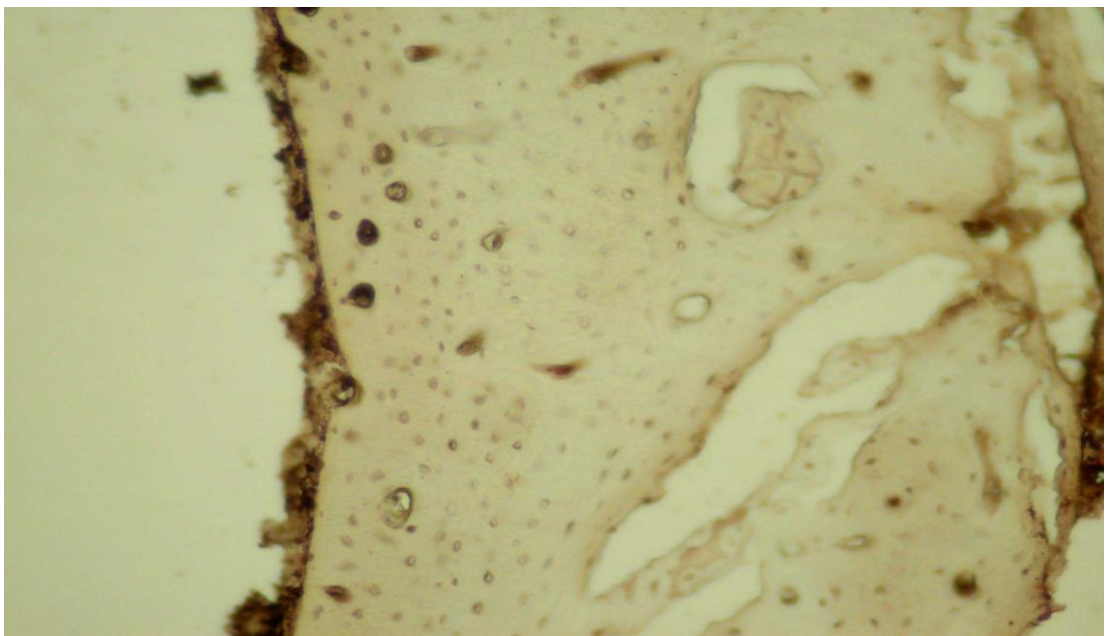
Numerosi osteoni, di cui uno piú grande al centro dell'immagine.  
Risulta debole la colorazione nucleare.



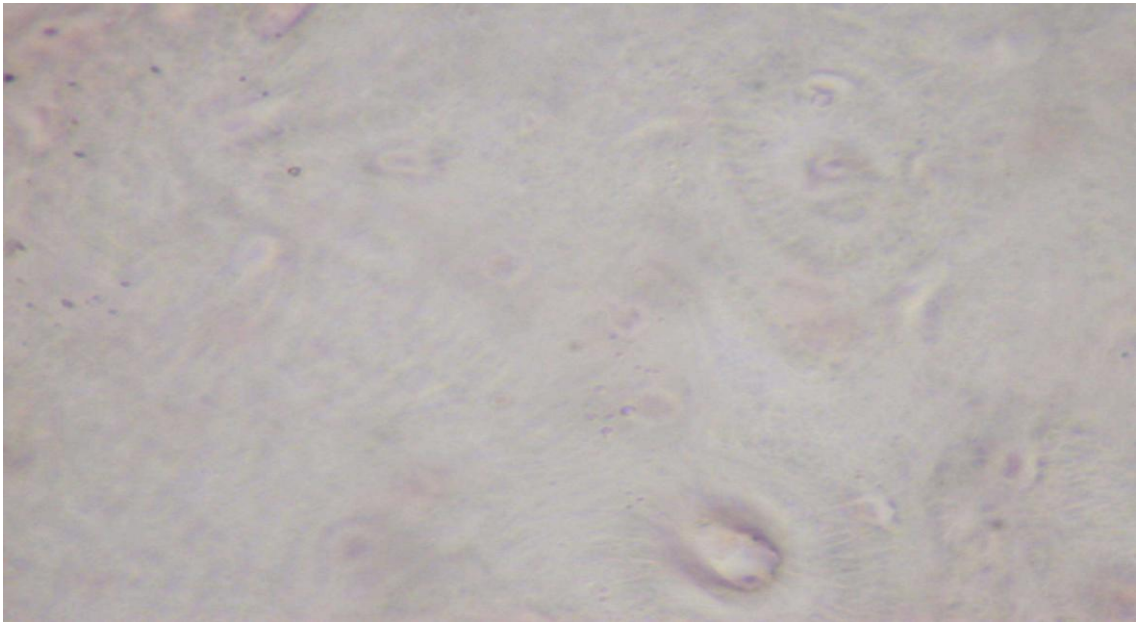
Osso controllo 4 giorni. Immagine n. 2.  
Numerosi osteoni. Scarsa colorazione reattiva alla  
bromodesossiuridina.



Osso dopo 4 applicazioni di Regenoterapia. Immagine n. 4.  
Stesse considerazioni dell'immagine n. 3.



Osso controllo 4 giorni. Immagine n. 3.  
Scarsissima visibilità di osteoni. Debole colorazione nucleare.



Osso e periostio dopo 4 applicazioni di Regenoterapia (una al giorno).

