

EFFETTI SUI LINFOCITI PRIMARI UMANI DELL'ESPOSIZIONE IN VITRO A SEGNALI TECAR¹ IN CONDIZIONI ATERMICHE

¹TRASFERIMENTO ELETTRICO CAPACITIVO-RESISTIVO

*Alejandro Úbeda, María Luisa Hernández-Bule, María Ángeles Trillo,
María Antonia Martínez, Joaquín Matilla Teresa Montero, Jocelyne Leal*

Servizi di Bioelettromagnetica e di Biochimica, Dipartimento di Ricerca
Ospedale Ramón y Cajal, Madrid

RIASSUNTO

Studi preliminari, di determinazione e stima della risposta in vitro all'esposizione a impulsi TECAR, da 0,575 MHz e segnale sinusoidale, hanno permesso di definire gli effetti di questo trattamento su cellule di due tipi diversi di cancro umano: NB69 neuroblastoma e HepG2 epatocarcinoma [1-4]. In questi studi si sono compiuti indagini e verifiche sulla risposta cellulare nei confronti di livelli di esposizione nei range atermico e termico (intensità di corrente tra 0,001-0,4 mA/mm²). Gli effetti osservati, specifici per specie cellulare, sono stati una diminuzione nella vitalità delle cellule NB69 e un decremento della proliferazione delle cellule HepG2.

Alcuni risultati dello studio della dinamica cellulare hanno indicato che le risposte erano mediate da alterazioni nel ciclo cellulare, che portavano a un arresto della divisione e in certi casi, alla morte delle cellule interessate. Il rapporto sollecitazione-risposta non seguiva una funzione lineare, dimostrando così che le risposte non sono attribuibili, in generale, a un effetto termico. Partendo da questo insieme di evidenze, si è concluso che l'esposizione a livelli subtermici di impulsi di tipo TECAR, applicata con successo in vari tipi di terapia [5-7], provoca effetti citotossici in colture di alcuni tipi di cellule cancerose. Le implicazioni di questi risultati sulle possibili applicazioni del sistema TECAR come coadiuvante nei trattamenti oncologici non possono essere valutate sulla base delle nostre attuali conoscenze, ma meritano di essere studiate. La questione ovvia, a partire dai dati descritti precedentemente, si pone nei termini della possibile specificità della risposta in vari tipi di cancro. O, in altri termini, il trattamento con impulsi TECAR induce risposte citotossiche solamente in tali tipi di cancro? Al contrario, l'effetto non è specifico, in modo tale che anche le cellule normali vedono compromettere la loro vitalità in reazione al trattamento? La risposta a questo interrogativo è cruciale per la comprensione dei principi di reazione cellulare agli impulsi TECAR e per la valutazione del potenziale terapeutico del trattamento basato su di esse. A tal fine, sono stati effettuati i lavori riportati qui di seguito.

PAROLE CHIAVE

Linfociti, neuroblastoma, epatocarcinoma, ipertermia.

MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono state utilizzate colture primarie di cellule ematiche normali ottenute da donatori volontari sani. Sono state selezionate cellule linfocitiche per l'interesse che presuppone lo studio dei possibili effetti del trattamento sulla risposta funzionale di cellule del sistema immunitario. Il protocollo sperimentale di isolamento cellulare è descritto qui di seguito.

1° ESTRAPOLAZIONE E SEMINA DEI CAMPIONI DI LINFOCITI:

dal sangue donato si isolano i leucociti mediante aggregazione degli eritrociti con Lymphoprep e centrifugazione. Dal pool di cellule mononucleate che ne risulta si ottengono i linfociti e i monociti mediante successive centrifugazioni. Una volta isolati, i linfociti si seminano in piastre di Petri, con una densità di $2,75 \cdot 10^6$ cellule/ml (Figura 1).

2° ESPOSIZIONE DELLE CELLULE AL CAMPO ENERGETICO:

Il protocollo di esposizione è identico a quello impiegato per il trattamento clinico dei tipi di cancro ed è stato descritto in relazioni precedenti. In breve, sono stati utilizzati elettrodi di acciaio inossidabile disegnati ad hoc per test in vitro. Questi elettrodi si collocano tanto in piastre di controllo, che non sono stimulate, quanto nelle piastre sperimentali, le quali vengono collegate fra loro ed allo stimolatore mediante un circuito seriale. Lo stimolo è applicato in periodi brevi seguendo cicli ON/OFF $< 1/20$ per 24 ore. La densità di corrente ($0,05 \text{ mA/mm}^2$) è stata scelta per due motivi:

- a) date le caratteristiche del mezzo di semina, si garantisce l'omeotermia delle colture durante la stimolazione;
- b) questa densità di corrente aveva portato a risposte significative e ripetibili nei due tipi di cancro umano.

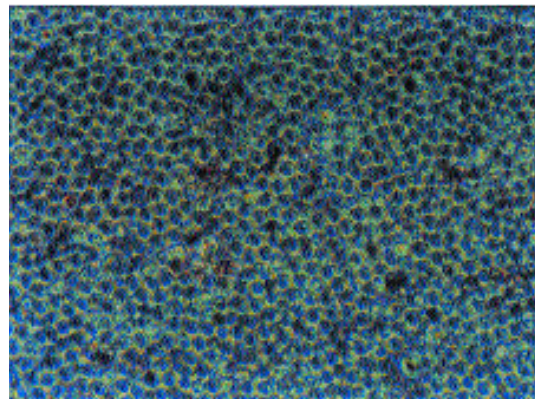


Figura 1. *Aspetto dei linfociti seminati nella piastra Petri.*

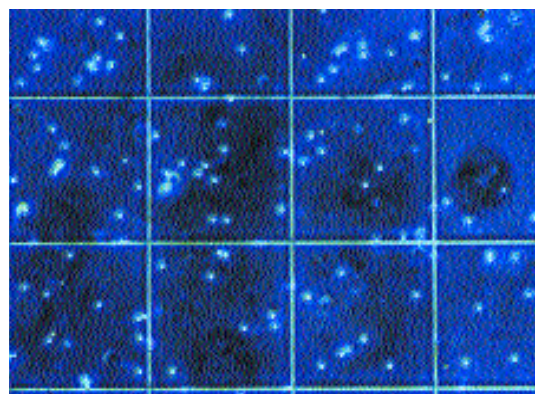


Figura 2. *Microfotografia della coltura di linfociti colorata con Trypan Blue. Le cellule vitali appaiono come sfere chiare, quelle danneggiate hanno un colore blu scuro.*

3° TEST ED ANALISI

Sono stati effettuati i seguenti tipi di test:

- ✓ Stima della vitalità cellulare mediante colorazione con Trypan Blue (TB). Questo marker, aggiunto a una sospensione cellulare, è in grado di attraversare esclusivamente membrane la cui integrità è stata modificata in modo significativo. Secondo questo, il TB penetra soltanto in cellule danneggiate, la cui vitalità è compromessa, dando loro un colore blu al microscopio a luce visibile. Le cellule vitali, che non sono permeabili alla molecola del marker, rimangono trasparenti (Figura 2).
- ✓ Determinazione biochimica mediante tecnica colorimetrica (Lowry-Burton) della concentrazione di proteine e DNA, per

campione e per cellula, per ogni gruppo sperimentale.

- ✓ Studio citomorfologico con colorazione e analisi dei campioni mediante la tecnica May-Grunwal-Giemsa.

I conteggi del numero di cellule vive e morte sono stati compiuti alla cieca e da due ricercatori diversi.

Fino ad ora sono state utilizzate due varianti del protocollo sperimentale:

- A** 24 ore di trattamento postsemina e elaborazione dei campioni al termine del trattamento (7 repliche sperimentali);
- B** 24 ore di incubazione postsemina, seguite da stimolazione per 24 ore e da elaborazione dei campioni (5 repliche). Inoltre, in due delle repliche sperimentali della serie B sono stati realizzati test di proliferazione cellulare, vitalità e citotossicità mediante analisi colorimetrica non radioattiva e citometria di flusso, che quantifica il numero assoluto di unità di ogni tipo cellulare presente nel campione.

RISULTATI

Esperimenti su 24 ore:

1. Studio di vitalità cellulare mediante la tecnica di esclusione di Trypan Blue: il conteggio realizzato per la determinazione della vitalità con TB rivela un maggior numero di cellule vive nei campioni che si sottopongono al trattamento. L'incremento nella vitalità è di un 10% sulle colture non esposte. Il test della t-Student indica che questa differenza è significativa ($p < 0,05$) (Figura 3).

2. Determinazione biochimica di proteine e DNA: sono stati quantificati i livelli totali di proteine e DNA in ogni campione, così come i livelli medi di proteine e DNA per cellula, in colture esposte al campo di 5 mA e nei loro rispettivi campioni di controllo. I livelli di proteine totali nei campioni esposti non differiscono da quelli osservati nei campioni di controllo (Figura 3). Però, è stata registrata una diminuzione del 7%, non significativa secondo il test statistico della t-Student, nella quantità media di proteina/cellula dopo la stimolazione. La quantità di DNA totale per campione nei gruppi esposti supera quella dei campioni di controllo

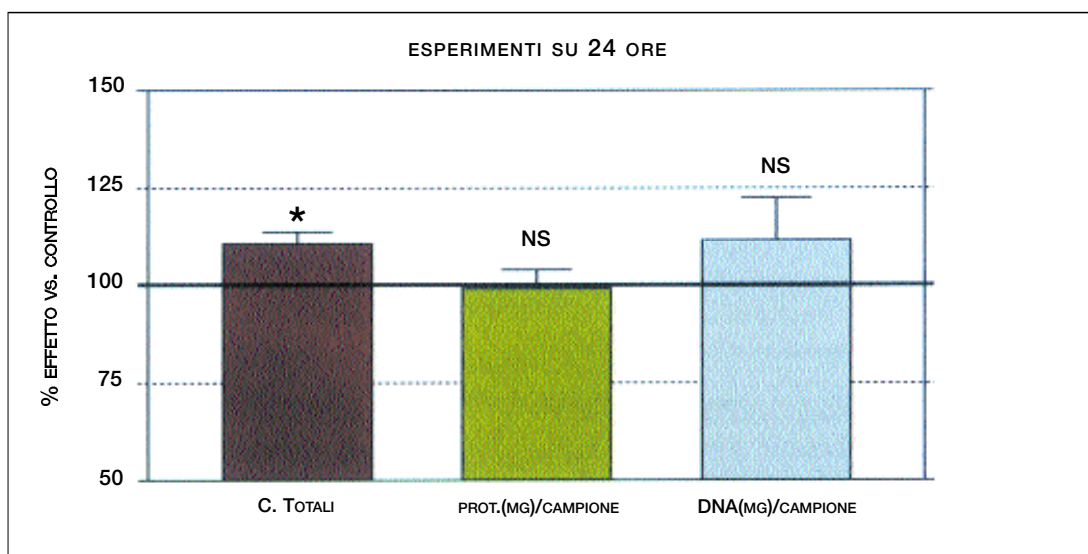


Figura 3. Risposta al trattamento in esperimenti di 24 ore. Percentuale di effetto rispetto ai campioni di controllo. (* : $p < 0,05$; NS: non significativo).

di un 10% (Figura 3). Questa differenza, tuttavia, non è significativa statisticamente. Neppure i livelli di DNA/cellula sono stati modificati dal trattamento. A partire dai dati precedenti è stato calcolato il rapporto proteina/DNA. Questo rapporto fornisce indizi su possibili effetti di differenziazione o di induzione della proliferazione cellulare. In questo caso, è stata verificata una leggera diminuzione nel rapporto proteina/DNA nel gruppo esposto (circa 7%). Tuttavia, questa differenza è troppo piccola per

essere significativa (test t Student).

3. Studio della morfologia cellulare: lo studio dei campioni mediante colorazione di May-Grunwal-Giemsa non ha rivelato cambiamenti nella morfologia delle cellule trattate paragonata a quella dei loro campioni di controllo (Figura 4).

Esperimenti su 48 ore: Esposizione durante le seconde 24 h di incubazione

1. Studio di vitalità cellulare mediante la tecnica di esclusione di Trypan Blue (Figura 5):

CAMPIONI DI CONTROLLO TRATTATI

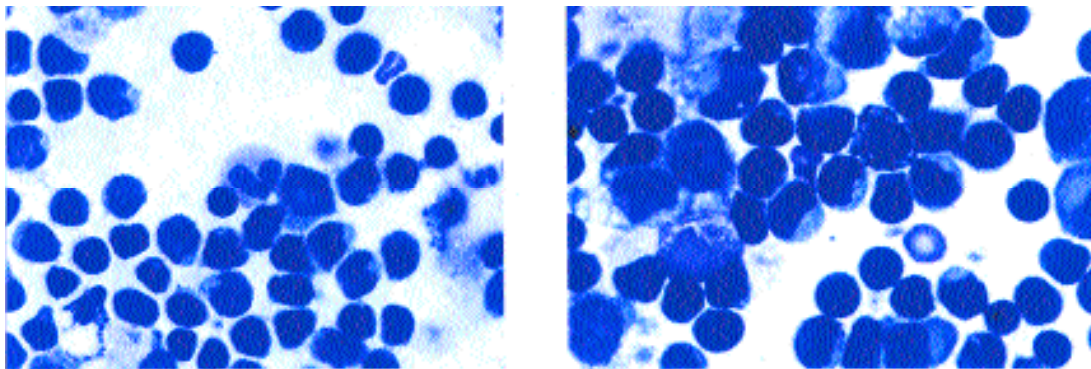


Figura 4. *Morfologia dei linfociti. Colorazione con May Grunwal-Giemsa. Esperimenti su 24 ore. L'esposizione non modifica la citomorfologia.*

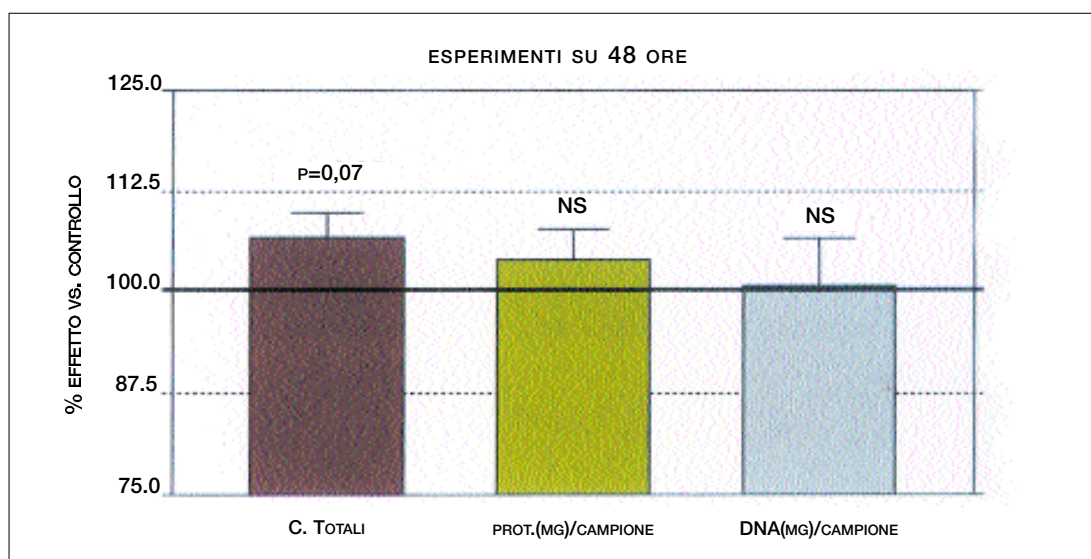


Figura 5. *Risposta al trattamento in esperimenti di 48 ore. Percentuale di effetto rispetto ai campioni di controllo. (NS: non significativo: $p > 0,1$).*

analogamente agli esperimenti descritti in precedenza, si è osservato una maggiore vitalità cellulare nei gruppi esposti rispetto ai campioni di controllo. Tuttavia, questa differenza, vicina al 7%, non è statisticamente significativa.

2. Determinazione biochimica di proteine e DNA: non si sono registrati effetti significativi del trattamento sui livelli di proteine, né per il totale delle proteine per campione (incremento del 4% sul campione di controllo, **Figura 5**), né nei livelli medi di proteina per cellula (diminuzione del 2% sul campione di controllo).

Non sono stati rilevati nemmeno effetti sui livelli totali di DNA nei campioni (**Figura 5**). Il rapporto DNA/cellula nei gruppi trattati ha dato come risultato una lieve diminuzione (6%), non significativa.

Nemmeno il rapporto proteina/DNA si è rivelata intaccata dal trattamento.

3. Studio della morfologia cellulare: non sono state osservate modifiche morfologiche fra le cellule esposte (**Figura 6**).

4. Test colorimetrico della vitalità: in due ulteriori esperimenti della presente serie è stato realizzato, oltre allo studio con Trypan Blue ed alla determinazione di proteine e DNA, un test colorimetrico non radioattivo per determinare la vitalità cellulare in funzione dello stato metabo-

lico delle cellule della coltura. L'obiettivo era confermare i risultati ottenuti con la tecnica TB (che valuta la vitalità in funzione dello stato della membrana cellulare) attraverso il confronto con quelli ottenuti da una tecnica colorimetrica che stima la vitalità in funzione dello stato metabolico delle cellule.

In questi due esperimenti la tecnica TB ha confermato nuovamente un aumento nella vitalità cellulare dei campioni trattati.

Lo studio colorimetrico, al contrario, non ha rivelato nessuna differenza tra i gruppi esposti ed i campioni di controllo. La non significatività di questo risultato è stata ulteriormente indagata mediante una prova colorimetrica di controllo positivo, trattando le cellule con un agente biochimico i cui effetti sulla vitalità dei linfociti sono ben conosciuti. Anche questo test ha fornito risultati negativi, cosa che rivela che il test colorimetrico scelto non è sufficientemente affidabile nella sua applicazione al tipo cellulare con il quale lavoriamo.

CONCLUSIONI

I risultati descritti non hanno rivelato indizi di effetti citotossici o citostatici in colture primarie di linfociti umani normali esposti per periodi di

CAMPIONI DI CONTROLLO TRATTATI

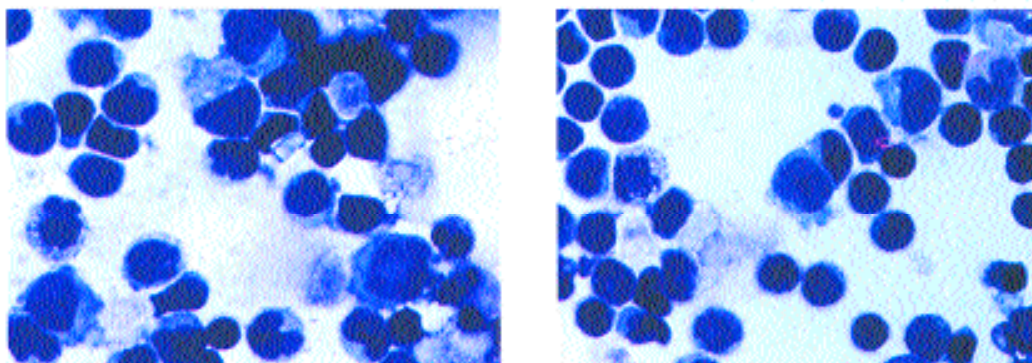


Figura 6. *Morfologia dei linfociti. Colorazione con May Grunwal-Giemsa. Esperimenti di 48 ore. L'esposizione non modifica la citomorfologia.*

24 h all'azione in vitro di correnti elettriche di segnale impiegate in terapie TECAR. Con protocolli analoghi di trattamento e incubazione, tali segnali avevano provocato risposte citostatiche e/o citotossiche in colture di cellule neoplastiche umane.

I dati sperimentali mostrano indizi secondo cui il trattamento in vitro potrebbe contribuire a preservare la vitalità cellulare in colture primarie. In queste colture di cellule normali, che per la loro stessa natura tendono a degradare rapidamente, l'esposizione al segnale TECAR all'inizio dell'incubazione avrebbe permesso di prolunga-

re la vitalità in una proporzione significativa di cellule (10%, $p < 0,05$), che altrimenti sarebbero morte in assenza del trattamento (Figura 7).

Quando l'esposizione ha luogo in colture il cui processo di degrado era iniziato 24 ore prima, il deterioramento della vitalità cellulare subisce un temporaneo rallentamento (Figura 8). Tuttavia, il cambiamento nella cinetica del degrado che subiscono le cellule normali a partire dalle ore 24 post-semine, farebbe sì che le possibili differenze legate al trattamento (7%; $p = 0,07$: non significativo) non possano raggiungere livelli statisticamente significativi ($p < 0,05$).

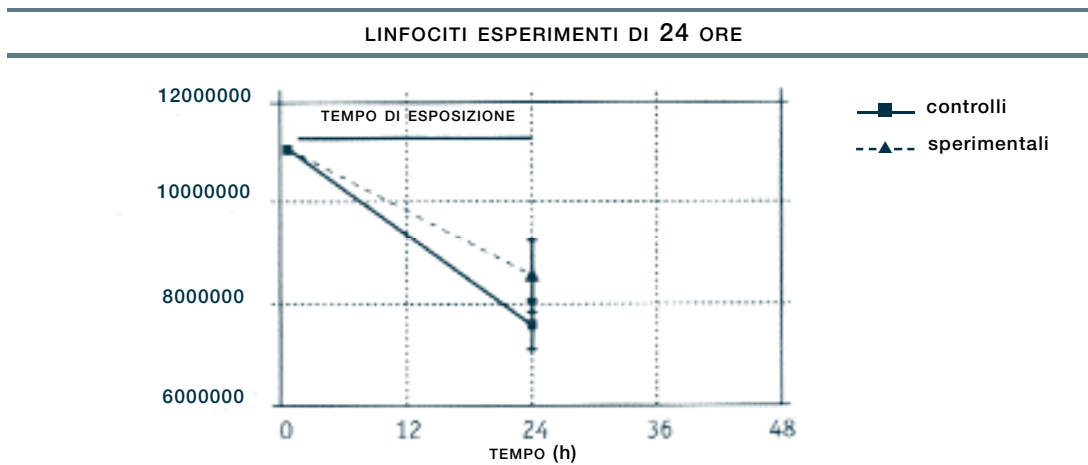


Figura 7. *Linfociti. Esperimenti su 24 ore. Evoluzione della coltura.*

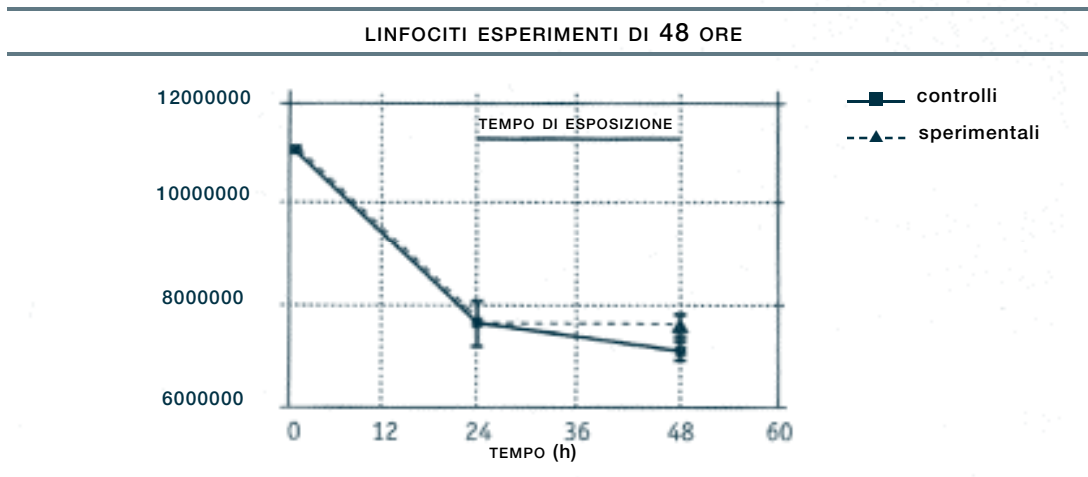


Figura 8. *Linfociti. Esperimenti di 48 ore. Evoluzione della coltura.*

I dati sui livelli di proteine e DNA, non rivelando differenze significative fra gruppi esposti ed i campioni di controllo, non forniscono un'informazione probante i possibili effetti del trattamento relativamente alla proliferazione e differenziazione cellulare.

In sintesi, i risultati dei presenti studi mostrano che gli effetti citotossici provocati dal trattamento in vitro con segnali TECAR in cellule umane neoplastiche (NB69 e HepG2), non si verificano in colture primarie di cellule umane normali (linfociti) ottenute da donatori volontari. Al contrario, questi linfociti pare vedano ridotto o ritardato il loro normale deterioramento, in

risposta a esposizioni di 24 ore. Le basi molecolari, i processi cellulari e i meccanismi biofisici responsabili dell'effetto non possono essere identificati a partire dalle informazioni di cui disponiamo attualmente. Tuttavia è plausibile l'ipotesi che alcuni effetti clinici indotti dal trattamento TECAR siano legati al documentato aumento della vitalità cellulare. Comunque, le eventuali implicazioni della risposta cellulare riferita all'azione terapeutica dei trattamenti TECAR in traumatologia o altre aree non possono essere determinate sulla base esclusiva di questi dati sperimentali e devono essere analizzate ulteriormente.

BIBLIOGRAFIA

1. ÚBEDA, A., DE BERNARDO, S., BAZÁN E., TRILLO, M. A., MARTÍNEZ, M. A., LEAL, J. (2000). Cytostatic Effects in human cancer cells exposed in vitro to 0.5-MHz electric currents. BEMS Twenty-Second annual Meeting, Munich June 11-16
2. TRILLO, M. A., DE BERNARDO, S., ÚBEDA, A., MARTÍNEZ, M. A., BAZÁN E., LEAL, J.; (2000). Changes in the cell cycle of human cancer lines exposed to 0.5-MHz currents. BEMS Twenty-Second annual Meeting, Munich June 11-16
3. ÚBEDA, A., DE BERNARDO, S., BAZÁN E., TRILLO, M. A., MARTÍNEZ, M. A., LEAL, J. (2000). Assay of biocompatibility for RF generated by a System for clinical applications of hypertermia. The Third World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine
4. TRILLO, M. A., DE BERNARDO, S., ÚBEDA, A., MARTÍNEZ, M. A., BAZÁN E., LEAL, J. (2000). Changes in the cell cycle of human cancer lines exposed to RF used in therapy with capacitive-resistive electric transfer (TECAR Therapy). The Third World Congress for Electricity and Magnetism in Biology and Medicine.
5. BALLESTER, F., F.; (2001). Aplicación de la Transferencia Eléctrica Capacitiva en Oftalmología (T.E.R.). Revista de D'Or de Oftalmología. 2º trimestre del 2001. Pág. 43-49
6. MONDARDINI ET AL. (1999). La Riabilitazione Verso il 2000, Bologna
7. CALPE J., GARCÍA C., HERNÁNDEZ R., GASPAR M., ROTELLAR E. (1998). Nuestra experiencia con un recuperador electrónico en lesiones vasculares de pacientes hemodializados. SEDYT. XIX/2, 19-22 (1998)