



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE
Indirizzo: Patologia e Clinica Animale (XXIX ciclo)

LA TECNOLOGIA REAC IN MEDICINA VETERINARIA
ESPERIENZE SPERIMENTALI E CLINICHE

REAC TECHNOLOGY IN VETERINARY MEDICINE
EXPERIMENTAL AND CLINICAL EXPERIENCES

Docente guida:
Prof. Eraldo Sanna Passino

Il Coordinatore:
Prof. Salvatore Naitana

Tesi di dottorato della Dott.ssa Sabrina Caggiu

Anno Accademico 2015-2016

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del Corso di Dottorato di ricerca in scienze veterinarie Curriculum Patologia e Clinica Animale dell'Università degli Studi di Sassari, A.A. 2013/2016 - XXIX ciclo, con il sostegno di una borsa di studio finanziata con le risorse dell'INPS – Gestione Ex INPDAP nell'ambito delle Iniziative Accademiche *Homo Sapiens Sapiens*.

INDICE

1. Summary.....	4
2. Introduzione.....	6
3. La Tecnologia-Piattaforma REAC ed i suoi protocolli.....	8
4. REAC. Esperienze su cellule e tessuti <i>in vitro</i>	15
Lavoro 1: REAC technology as optimizer of stallion spermatozoa liquid storage	20
5. Esperienze sperimentali <i>in vivo</i>	54
Lavoro 2: REAC technology regenerative treatment tested to healing experimental chondral lesions in ovine animal model	54
6. Esperienze cliniche	72
Lavoro 3: Valutazione della REAC terapia in cani con rottura del Legamento Crociato Craniale (CCL). Valutazioni preliminari.....	77
Casi clinici	90
7. Conclusioni	111
8. Bibliografia	113

1. SUMMARY

Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) Technology is a platform technology for bio and neuro modulation, patented at international level (WO2001EP07800, EP1301241, US7333859 and other patents pending).

The scientific background of REAC technology platform is based on a fundamental phenomenon for life: cells have an asymmetric structure, as several cellular components, including plasma membrane, cytoskeleton or organelles, asymmetrically organized. This cell structure implies that ion channels are asymmetrically distributed throughout cellular membrane and this generates ionic fluxes. These ionic fluxes in turn produce currents and these currents produce bioelectric fields. This phenomenon takes the name of "Cell polarity".

Cell polarity is at the base of correct cell bioelectric activity and is implicated in important processes that influence normal cell functions such as cell differentiation, proliferation, morphogenesis, migration and neurotransmission in unicellular and multicellular organisms. Epigenetic factors, trauma, infections and other factors alter the mechanism of action of the cell polarity. This blocks the correct production of ion fluxes in cells and tissues, and consequently it alters electro-metabolic activity, functions and reparative processes in cells and tissues.

The mechanism of action of REAC Technology is aimed to restore the correct cell polarity.

This optimization of cell polarity allows the proper recovery of cellular electro-metabolic processes, moreover cell migration, proliferation and differentiation, by promoting reparative and regenerative process of tissues.

REAC technology is so effective to induce remarkable biological effects at many scales, from gene modulations up to functional neuro biological optimization. The effects of REAC Technology are completely pervasive and have no limit in depth in the tissues to be treated.

The results obtained *in vitro* and *in vivo* suggest a role of REAC in regenerative medicine that opens new scenarios in neurological, vascular, orthopaedic, trauma, and tissue repair.

The key features of REAC technology are the absolute safety, ease of use, the presence of effective standardized protocols validated by years of use and the ability to be associated with other pharmacological and surgical treatments, supporting and enhancing them.

All these features can open up new perspectives of REAC technology use in veterinary medicine.

2. INTRODUZIONE

La tecnologia Radio Electric Asymmetric Conveyer for therapeutic use (REAC) è una tecnologia brevettata a livello internazionale (WO2001EP07800, EP1301241, US7333859 e altri), nata specificatamente per usi terapeutici presso l'Istituto Rinaldi Fontani di Firenze, Istituto di cura, ricerca e formazione nel campo dei disturbi e malattie su base epigenetica (www.irf.it).

La base scientifica della piattaforma tecnologica REAC è basata su un fenomeno fondamentale per la vita: le cellule hanno una struttura asimmetrica, come le diverse componenti cellulari, tra cui la membrana plasmatica, citoscheletro e organuli, asimmetricamente organizzata. Questa struttura cellulare implica che i canali ionici siano distribuiti asimmetricamente su tutta membrana cellulare e questo genera flussi ionici. Questi flussi ionici, a loro volta, producono correnti e queste correnti producono campi bioelettrici. Questo fenomeno prende il nome di "Cell polarity".

La Cell polarity è alla base della corretta attività bioelettrica cellulare ed è coinvolta in importanti processi che influenzano le normali funzioni cellulari, quali la differenziazione cellulare, la proliferazione, morfogenesi, migrazione e neurotrasmissione sia in organismi unicellulari che multicellulari. L'istituzione e il mantenimento della cell polarity coinvolge molti processi tra cui la cascata di segnali che controllano le attività di membrana e le dinamiche del citoscheletro, i quali devono essere coordinati e regolamentati in maniera altamente precisa. Fattori epigenetici, traumi, infezioni e molti altri fattori alterano il meccanismo di azione della cell polarity. Questo blocca la corretta produzione dei flussi ionici nelle cellule e nei tessuti alterando l'attività elettro-metabolica e, di conseguenza, le funzioni e i processi riparativi causando disturbi dello sviluppo e l'insorgenza delle malattie.

Il meccanismo d'azione della tecnologia REAC prova a ripristinare la corretta cell polarity. Infatti, la tecnologia REAC è in grado di trasmettere correttamente i flussi ionici

in maniera asimmetrica e di ricreare correnti ioniche, "resettando" i campi bioelettrici alterati e quindi facilitando il recupero della corretta attività elettro-metabolica delle cellule.

Questa azione facilita la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare, promuovendo l'azione riparativa ed processo di rigenerazione dei tessuti.

La tecnologia REAC è efficace e induce effetti biologici apprezzabili in molti campi, dalle modulazioni geniche fino alla ottimizzazione biologica neuro funzionale tanto da ipotizzare, nel prossimo futuro, un importante ruolo della tecnologia nella medicina rigenerativa.

Le caratteristiche principali della tecnologia REAC sono l'assoluta sicurezza, la facilità d'uso, la presenza di protocolli standardizzati efficaci convalidati da anni di utilizzo e la possibilità di essere associata, a loro sostegno e valorizzazione, ad altri trattamenti farmacologici e chirurgici. Gli effetti della tecnologia REAC sono completamente pervasivi e non hanno alcun limite di profondità nei tessuti da trattare.

Tutte queste caratteristiche ci consentono di ipotizzare nuove prospettive di utilizzo della tecnologia REAC in medicina veterinaria.

3. La piattaforma-tecnologia REAC (*Radio Electric Asymmetric Conveyor*)

L'Epigenetica studia le modificazioni prodotte nell'organismo dagli innumerevoli fattori dell'ambiente, come ad esempio i nostri stili di vita, l'alimentazione, le sostanze con cui veniamo a contatto, il tipo di attività lavorativa, lo stress cronico. L'Istituto Rinaldi Fontani è un Istituto di cura, ricerca e formazione nel campo dei disturbi e malattie su base epigenetica.

Per trattare in modo specifico e scientifico le patologie di origine epigenetica, i medici fondatori dell'Istituto, Salvatore Rinaldi e Vania Fontani, hanno studiato e messo a punto la piattaforma -tecnologia Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC).

La Tecnologia REAC è una innovativa piattaforma tecnologica medica ideata specificamente per consentire nuove metodiche terapeutiche di Bio e Neuro modulazione nell'ambito delle patologie di origine epigenetica.

Le più comuni patologie su base epigenetica in ambito biologico sono le alterazioni del controllo metabolico, le malattie cronico-degenerative dei vari apparati (cardio vascolare, endocrino, immunitario e muscolo scheletrico) ed i disturbi legati all'invecchiamento.

Le prevalenti patologie sempre su base epigenetica, ma in ambito neurologico e psichiatrico, sono le malattie psichiatriche, le patologie neurologiche dello sviluppo e le malattie neurodegenerative, in particolare quelle associate all'invecchiamento quali l'Alzheimer, il Parkinson e le demenze senili.

Lo scopo della tecnologia REAC® è creare degli effetti terapeutici di bio e neuro stimolazione/modulazione, attraverso l'utilizzo di campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico.

L'obiettivo dei trattamenti terapeutici con la Tecnologia REAC è quello di agire sulla capacità di risposta dell'organismo, portandola gradualmente alla sua massima efficienza innescando, quindi, una graduale ottimizzazione delle funzioni dell'intero

organismo, a livello biologico, psichico e fisico. I protocolli terapeutici della Tecnologia REAC trovano la loro naturale applicazione in particolare in neurologia, nelle patologie stress correlate, in ortopedia e traumatologia, e in tutte quelle condizioni patologiche, sia traumatiche che infiammatorie, che possono affliggere i nostri animali, in primo luogo cani e cavalli, durante la loro attività sia a livello sportivo che amatoriale.

Gli specifici protocolli della tecnologia REAC sono in grado di ottimizzare la gestione neuro-muscolare ed il gesto atletico, oltre che attuare una prevenzione dei traumi.

E' noto come le radiofrequenze interagiscano con tutte le strutture che contengono cariche elettriche, come ad esempio il corpo umano, e inducano in esse delle correnti. Queste correnti variano in accordo con le caratteristiche molecolari dei tessuti. La Tecnologia REAC genera un'emissione a radiofrequenza di bassissima intensità la cui peculiarità non è l'emissione in sé, ma la particolare connessione tra l'apparecchio ed il corpo del paziente. La sonda convogliatrice asimmetrica (Asymmetric Conveyer Probe - ACP), assoluta innovazione della Tecnologia REAC, rappresenta questa connessione.

Perché la REAC è una tecnologia “asimmetrica”?

Un normale circuito elettrico è dotato di due poli, uno negativo e uno positivo (circuito simmetrico); nella Tecnologia REAC, invece, abbiamo un solo polo fisico (circuito asimmetrico) che diviene l'attrattore (convogliatore asimmetrico – Asymmetric Conveyer) delle correnti indotte nel corpo dall'emissione a radiofrequenza. Questo schema è stato ideato per uno specifico scopo: creare un circuito asimmetrico per meglio interagire con il meccanismo asimmetrico che sta alla base della cell polarity, al fine di ottimizzarne le funzioni. Infatti, la Tecnologia REAC è in grado di modulare i flussi di corrente esistenti a livello cellulare e a livello dell'organismo, quando questi flussi siano alterati.

Un'altra peculiarità della Tecnologia REAC è la bassa potenza usata nell'emissione a radio frequenza. Questo è necessario per indurre flussi di corrente comparabili con

quelli della cell polarity. Livelli più alti di potenza disturberebbero i meccanismi di aggiustamento della cell polarity, fenomeno pericoloso, in quanto una disregolazione della cell polarity può causare disordini nell'evoluzione cellulare.

La Tecnologia REAC non dipende dall'emissione a radiofrequenza usata. L'apparecchio REAC usa soltanto due frequenze (2.4 and 5.8 GHz) scelte per due motivi. Innanzitutto, queste sono le due frequenze più utilizzate ed autorizzate a livello internazionale. In secondo luogo, sulla base dell'esperienza clinica e scientifica, la frequenza a 2.4 GHz è stata scelta per meglio interagire con i tessuti e le colture cellulari (4-15), mentre la frequenza a 5.8 GHz è stata scelta per meglio interagire con il sistema nervoso (16-37).

La cell polarity è coinvolta nei processi di differenziazione, proliferazione e morfogenesi delle cellule ed è alla base dell'organizzazione asimmetrica delle componenti e strutture della cellula. La creazione e il mantenimento della cell polarity condiziona molti processi, tra i quali i segnali a cascata, gli scambi di membrana e le dinamiche del citoscheletro. Questi processi devono essere coordinati in modo finemente regolamentato (38).

Lo scopo della Tecnologia REAC è ottimizzare i flussi ionici a livello molecolare e concentrare le micro correnti prodotte da questi flussi ionici in punti o aree specifiche del corpo, allo scopo di ottimizzare l'attività elettrometabolica delle cellule e dei tessuti (cell polarity). Tutto ciò induce notevoli effetti biologici, dalla modulazione genica (6,7,9,10,12-14) alla rimodulazione funzionale globale (8,16,17).

3bis. I Protocolli terapeutici

Protocolli di Neurostimolazione (VNPO, VNPPPO)

A. Ottimizzazione Neuro Posturale® (VNPO)

E' un sofisticato protocollo di neuro modulazione del tutto indolore, che dura pochi istanti, privo di effetti collaterali e i cui risultati tendono ad essere stabili nel tempo.

Consiste nel posizionamento per alcuni millisecondi di un puntale sonda dell'apparecchiatura REAC su una specifica zona del padiglione auricolare localizzata alla base del margine dell' *Antitragus*.



Foto n. 1

VNPO

Serve a determinare l'inizio dei processi di ottimizzazione delle funzioni neuromotorie e neuropsichiche e può determinare importanti fenomeni di recupero funzionale e la riduzione di alcune sintomatologie algiche con il recupero di migliori strategie motorie sia nel soggetto sano che in quello patologico, ad esempio nelle spasticità di varia natura.

B. Ottimizzazione Neuro Psico Fisica® (VNPPPO)

E' uno speciale protocollo di neuro stimolazione indolore, privo di effetti collaterali che consiste nel posizionamento per alcuni minuti di una sonda laminare di alluminio, claim brevettuale, sulla regione retro nucale secondo una precisa procedura. La VNPPPO viene somministrata in cicli terapeutici, ciascuno composto da 18 sessioni.



Foto n. 2 A



Foto n. 2 B



Foto n. 2 C

VNPPO

Possono essere previsti più cicli terapeutici che variano in rapporto allo stato di salute o malattia del soggetto in trattamento. Serve a determinare una progressiva ottimizzazione delle funzionalità neurologiche, psichiche e fisiche sia in soggetti sani che con patologie di varia natura.

Protocolli di Biostimolazione (VTO, VCO, RPR)

Sono in grado di ridurre i processi infiammatori, di migliorare l'ossigenazione dei tessuti, di attivare meccanismi di riparazione e rigenerazione che contrastano la disorganizzazione dei tessuti, che a sua volta facilita l'insorgenza dei fenomeni degenerativi.

A. Ottimizzazione Tissutale®

Costituisce il trattamento di base specifico per trattare un ampio numero di quadri sia di tipo infiammatorio che post traumatico. I trattamenti si effettuano coprendo la zona da trattare con una speciale sonda laminare in alluminio, claim brevettuale, collegata all'apparecchiatura REAC.

Normalmente viene somministrata in cicli terapeutici di almeno 12 sedute. Il numero dei cicli di trattamento varia in rapporto al quadro clinico. **Ottimizzazione Tissutale®** è il nome che raggruppa un insieme di protocolli terapeutici che si suddividono in varie tipologie:

- **Base:** per il trattamento di esiti di traumatismi e situazioni infiammatorie, acute e croniche;
- **Riparativa:** per la riparazione di tessuti sia superficiali che profondi (ossa, muscoli, organi interni);
- **Rigenerativa.**



Foto n. 3 A

VTO



Foto n. 3 B

VTO

4. REAC. Esperienze su cellule e tessuti

Al fianco di metodologie convenzionali rappresentate dagli stimoli chimici, vengono ricercate e applicate strategie innovative, metodiche che permettano il controllo del differenziamento e dispositivi capaci di trasmettere alla cellula i segnali necessari per indirizzarla verso il fenotipo di interesse.

Visualizzare il sistema vivente come un entità elettromagnetica sottolinea la presenza di segnali elettrici e magnetici endogeni che sono indicativi dei livelli di organizzazione dei sistemi viventi e che sono direttamente legati alle funzioni biologiche quali lo sviluppo, la crescita e la riparazione dei tessuti.

Gli effetti dei campi elettromagnetici ed in particolare di Radiofrequenze (2.4GHz) emesse dal REAC (*Radio Electric Asymmetric Conveyer*) un innovativo dispositivo medico, un biostimolatore di ultima generazione, sui sistemi biologici, sembrano dipendere dalle caratteristiche fisiche del segnale, dai parametri di esposizione e dal tipo cellulare, e influenzano i diversi processi.

Le radiofrequenze emesse dal REAC inducono una modificazione delle microcorrenti a livello delle cellule bersaglio; tali variazioni elettriche vengono captate da un'antenna e convogliate nuovamente sulla coltura cellulare o tessuto. In questo modo il REAC è in grado di ottimizzare un segnale di risposta che è intrinseco nel tessuto o nelle cellule stesse.

In questo breve capitolo ci soffermeremo sulle esperienze maturate nel corso degli ultimi anni dalla nostra équipe di ricerca sull'utilizzo della tecnologia REAC su cellule, con particolare riferimento a cellule staminali embrionali.

Lo scopo del primo studio effettuato (Maioli, M. et al. - *Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages*. Cell Transplant 2013, 22, 1227-1235) è stato valutare se Cellule Staminali Embrionali murine, le R1, sono sensibili all'azione di uno stimolo

fisico come la Radiofrequenza di 2,4 GHz, prodotta dal REAC, e se tale stimolo fosse in grado di influenzare positivamente la comparsa di trascritti capaci di guidare l'orientamento cellulare verso specifici fenotipi, come la Prodynorphin, GATA4 e Nkx-2.5 per la cardiogenesi, come MyoD per la miogenesi scheletrica, e la Neurogenin1 per la neurogenesi.

L'espressione dei geni d'interesse è stata valutata attraverso la real-Time PCR che ha rivelato un aumento significativo dell'espressione di Prodynorphin dopo 24 ore di esposizione al REAC, e rimanendo marcata ancora dopo 48 ore di trattamento. È importante sottolineare che, anche dopo che lo stimolo è stato sospeso l'aumento della trascrizione persiste fino a 7 giorni. L'effetto del REAC sulla trascrizione della Prodynorphin è degno di considerazione per la capacità di questo gene e del suo relativo prodotto la dinorfina B di controllare l'omeostasi del Ca²⁺ citosolico, la contrattilità in cardiomiociti adulti e di indurre la trascrizione di geni implicati nel differenziamento cardiaco in cellule ES attraverso l'attivazione di circuiti autocrini, e segnalazioni nucleari intracrine da parte dei recettori degli oppioidi, infatti le cellule ES trattate con il REAC mostrato un aumento significativo dell'espressione dei geni di GATA4 e Nkx 2,5 che codificano rispettivamente per un zinc finger e un homeodomain essenziali per la cardiogenesi in diverse specie animali compresi gli esseri umani.

La trascrizione di MyoD e Neurogenin1 è risultata significativamente aumentata con andamenti nel tempo simili e persistenza dopo la sospensione dello stimolo, mentre l'espressione dei geni della staminalità quali Sox2, Nanog, e Oct 4 è inibita.

Per valutare se le risposte osservate a livello della trascrizione genica rappresentano l'inizio di una resa maggiore di differenziamento è stato studiato l'effetto del REAC sull'espressione di un certo numero di proteine marker tessuto specifiche. L'analisi con Western blot ha rivelato che i rappresentanti del differenziamento cardiaco, GATA4, neuronale, β -3-tubulina, e muscolo scheletrico, MyoD, sono significativamente più espressi nelle cellule ES trattate con il REAC rispetto alle cellule

di controllo non trattate, con andamenti simili. L'aumento dell'espressione di queste proteine diventa evidente dopo 48 ore di trattamento, persistendo durante i 7 giorni successivi, anche in assenza di stimolazione. Nelle cellule esposte al REAC, l'espressione proteica di Sox2, e Nanog rispecchia l'espressione genica, con una riduzione marcata, maggiore rispetto ai controlli non trattati. La sovraespressione di proteine marker tessuto-specifiche come l' α sarcomericactinin e la MYC per il fenotipo cardiaco, Myogenin e MyoD per il muscolo scheletrico, e β 3 tubulin per quello neuronale, in cellule ES trattate con il REAC è stata confermata anche dall'analisi di microscopia confocale. Evidenziando la capacità del REAC di modulare il patterning delle proteine di cellule intatte. Il raggiungimento di un fenotipo cardiaco è stata ulteriormente dedotto dall'osservazione che il trattamento REAC determina un notevole aumento del numero delle colonie battenti spontanee.

La capacità rigenerativa delle cellule staminali mesenchimali non è legata solo al tessuto d'origine e all'età del donatore ma anche agli effetti che la senescenza determina sui processi di self-renewal e sul potenziale differenziativo.

Le cellule staminali isolate da tessuto adiposo ADhMSCs se mantenute in coltura per molti passaggi, vanno incontro a senescenza, perdendo così il loro potenziale differenziativo e riparativo. Il controllo molecolare di tale processo dipende da due differenti pathways: telomerase dipendente e telomerase indipendente; il primo legato all'azione della telomerase, una ribonucleoproteina specializzata che ha il compito di stabilizzare i telomeri, il secondo legato ad eventi epigenetici quali le modificazioni istoniche e il rimodellamento della cromatina che regolano l'espressione di geni come Bmi1, implicati nel self-renewal e nella senescenza, e Nanog, Oct4, Sox2 and cMyc fattori di trascrizione che regolano la pluripotenza e il differenziamento. Per valutare quale pathways che regola la senescenza, è influenzata dal REAC (Radio Electric Asymmetric Conveyer) le ADhMSCs sono state trattate per 4-8-12h ai passaggi 5-10-15-20-25-30. Nelle cellule di controllo la senescenza replicativa è evidenziata maggiormente negli ultimi passaggi (25-30) dalla diminuita espressione

di Bmi 1, Nanog, Oct4, Sox2 e Tert, dal declino dell'attività della telomerasi e dell'aumentata positività alla β -galattosidase (SA- β -Gal). Il trattamento con la tecnologia REAC determina un rallentamento della senescenza, contrastando l'inibizione dell'espressione dei fattori di trascrizione Bmi 1, Nanog, Oct4, Sox2 responsabili del self-renewal e della pluripotenza, dell'unità catalitica della telomerasi Tert, contrastando l'accorciamento dei telomeri, soprattutto al 25°-30° passaggio.

Per capire quale fosse il meccanismo molecolare coinvolto, le ADhMSCs tenute in coltura sino al 30° passaggio, sono state trattate con il REAC per 12h in presenza o assenza del 4-methylumbelliferone (4-MU) inibitore della sintesi dell'acido ialuronico attraverso la repressione della HAS2. I risultati evidenziano che il REAC con l'HA endogeno e le HA-bindingproteins creano un network che modula la polarità cellulare, influenzando il flusso ionico e l'ambiente intracellulare, determinando un rallentamento dei processi legati alla senescenza, una minore risposta cellulare alla β -galattosidasi (SA- β -Gal), una maggior espressione dei geni della staminalità come OCT4, SOX2 e NANOG e di TERT e quindi una maggiore attività della telomerasi nell'allungamento dei telomeri.

Studi *in vivo* evidenziano gli effetti positivi della neuro modulazione magnetica con la tecnologia REAC, nel trattamento di malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (PD). L'effetto in vitro del REAC è stato inoltre valutato su cellule PC12 (rat adrenal pheochromocytoma cell line), in precedenza utilizzate come modello per comprendere le funzioni neuronali e per capire la fisiologia dei neuroni dopaminergici. Le PC12 sono state esposte per 24-48-72-96-120-144-168-196 ore, e la valutazione dell'espressione dei geni associati al fenotipo neurogenico, quali β 3-tubulin, neurogenin-1, e nervegrowthfactor (NGF) e tyrosinehydroxylase (TH), ha evidenziato un aumento della β 3-tubulin a partire dalle 96h, della neurogenin-1 a partire dalle 24h e NGF e TH a partire dalle 48h rispetto al controllo non trattato. L'esposizione indirizza

le cellule verso un fenotipo neurogenico e induce la comparsa di cellule simili ai neuroni, mentre l'aumento di NGF, un importante regolatore della proliferazione, porta ad una diminuzione del tasso di proliferazione, inducendo arresto del ciclo cellulare in G0/G1, e nel contempo induce il differenziamento verso neuroni in grado di produrre dopamina.

(con il supporto della prof.ssa Margherita Maioli – Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, componente gruppo di lavoro REAC)

Lavoro 1

REAC TECHNOLOGY AS OPTIMIZER OF STALLION SPERMATOZOA LIQUID STORAGE

accettato per la pubblicazione sulla rivista Reproductive Biology and Endocrinology, rif. RBEJ-D-16-00299R1, in data 30-01-2017)

Autori: F. Berlinguer; S. Rinaldi; V. Pasciu; S. Succu; I. Cossu; S. Caggiu; D. Addis; A. Castagna; V. Fontani; E. Sanna Passino

Reproductive Biology and Endocrinology, ISSN: 14777827, Q1, IF: 2.147

Abstract

Background: The REAC technology (acronym for Radio Electric Asymmetric Conveyor) is a technology platform for neuro and bio modulation. REAC technology has already proven to optimize the ions fluxes at the molecular level and the molecular mechanisms driving cellular asymmetry and polarization.

Methods: In this study, we used this technology to try to improve spermatozoa functions, DNA integrity and maintain them longer during liquid storage. At 0, 24, 48, and 72 hrs, a battery of analyses was performed to assess spermatozoa viability, motility parameters, acrosome status, and DNA integrity before and after REAC treatment. Spermatozoa oxidative status was assessed by determining lipid peroxidation, the activity of superoxide dismutase (SOD), and the total antioxidant capacity.

Discussion: REAC treatment showed its effects in the analyses of acrosome membrane and DNA integrity that proved to be better preserved in REAC treated spermatozoa compared to untreated controls. Moreover, the analysis of the oxidative status indicated that the mean activity of the intracellular superoxide dismutase (SOD) was significantly higher in REAC treated spermatozoa compared to untreated controls ($p < 0.05$), while the intracellular concentration of malondialdehyde (MDA), an end

product of lipid peroxidation, at the end of the REAC treatment was higher in untreated controls ($p > 0.05$). The REAC efficacy on spermatozoa oxidative status was also evidenced by the higher trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) found in both the cellular extract ($p < 0.05$) and the storage media of REAC treated spermatozoa compared to untreated controls ($p < 0.0001$). The study demonstrated that REAC treatment preserves spermatozoa acrosome membrane and DNA integrity, likely thanks to the enhancement of sperm antioxidant defences after REAC treatment.

Conclusion: These results open new perspective about the extending of spermatozoa life span in vitro and the clinical management of male infertility.

Background

The REAC technology (acronym for Radio Electric Asymmetric Conveyor) is a technology platform for neuro and bio modulation. REAC technology has already proven to optimize the ions fluxes at the molecular level and the molecular mechanisms driving cellular asymmetry and polarization. REAC technology recovers the correct cell polarity, which drives the migration, proliferation and differentiation of a host of cell types and promotes reparative and regenerative process of tissues [1-8].

Sperm cells are polarized cells [9]. Development, survival and effectiveness of sperm are closely linked to the phenomena of cell polarity. On these bases, we checked whether REAC technology is effective in extending and maintaining sperm functions and DNA integrity during liquid storage at 4°C. In fact, sperm cryopreservation and sperm liquid storage by short-term refrigeration at +4°C lead to a significant decline in sperm quality [10]. In particular, during sperm liquid storage, we observe a deterioration of sperm functions also followed by DNA damage [11].

Oxidative stress has been proposed to be a major factor involved in sub lethal cryodamage of sperm in many species, including horses [12, 13]. After semen dilution and cryopreservation, there is a significant reduction in the level of spermatozoa antioxidants, thus leading to an enhanced susceptibility of these cells to peroxidative injuries. In addition, semen cryopreservation is associated with increased generation of reactive oxygen species (ROS) [14, 15]. Spermatozoa are vulnerable to oxidative attack because they contain an abundance of polyunsaturated fatty acids that are susceptible to lipid peroxidation. Functionally important proteins and DNA are also subject to oxidative modification and adduction by aldehydes, generated as a consequence of the peroxidative process [16]. Oxidative stress ultimately triggers the intrinsic apoptotic pathway, leading to a rapid loss of motility and cell death. As suggested by Riel et al. [17], the iatrogenic damage caused by semen dilution and cryopreservation may be also due to the presence of ions in the surrounding medium coupled with sperm membrane changes occurring during storage at non-physiological temperatures. Sodium-potassium-dependent ATPase, which regulates proper intracellular concentration of sodium, is highly sensitive to hypothermia. At low temperatures, reduction of its activity impairs proper functioning of the sodium pump, resulting in uptake of sodium ions from extracellular milieu. Sodium ions were shown to be detrimental to the nucleus and DNA [18, 19]. In addition, a perturbation of ion flows can result in alterations of plasma and mitochondrial membranes resting potential and thus of cell functions. Plasma membrane resting potential arises from the combined action of ion channels and ion pumps, and it regulates cell-autonomous properties such as proliferation, differentiation and apoptosis in mature somatic cells as well as stem cells [20]. The loss of mitochondrial membrane potential has been associated with a significant increase in ROS generation [21, 22]. All these phenomena are related to alterations of cell polarity and may be responsible for hampering cell preservation at low temperatures.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals in this study were purchased from Sigma Chemical CO. (St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

Description of Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) Technology

Radio Electric Asymmetric Conveyer Technology (REAC) is a technological platform for bio and neuro modulation. A detailed description of REAC mechanism of action can be found in Maioli 2016 [2]. In this study, we used the biomodulation REAC-VIVSI treatment protocol. The REAC device used in this study was B.E.N.E (ASMED, Florence, Italy).

Ethics

This study followed ethical guidelines for care and use of agricultural animals for research (EC Directive 86/609/EEC for animal experiments). All experimental protocol were approved by OPBSA (Rector's decree n° 2688/2014 - 03/10/2014 n° 24600).

Semen source and preparation

The experimental procedures were carried out during horse breeding season (January–July). Semen collection was carried on at the Department of Stallion Reproduction of the Regional Agency for Research in Agriculture (AGRIS Sardegna, Ozieri, Sassari, Italy), while the analytical work was carried on at the laboratories of the Department of Veterinary Medicine of the University of Sassari (UNISS, Sassari, Italy). These facilities meet the requirements of the European Union for Scientific Procedure Establishments. Ejaculates were obtained by artificial vagina from 8 adult

stallions of different ages (from 12 to 24 years), and different breeds. In particular, stallions were identified with progressive number from 1 to 8 (stallion 1: Thoroughbred; stallions 2, 3, 4, 6: Arabian; stallions 5, 7, 8: Warmblood). The stallions were housed individually in boxes, and fed both good hay *ad libitum*, and 2.5 kg of concentrates twice daily. At the moment of the study, they had been housed in AGRIS for over five years and used exclusively for breeding, and they are currently still housed at the same center. All evaluated stallions had a career in sports flat racing and show jumping.

The 8 stallions enrolled in this study were used for breeding, and the frequency in semen collection during the entire breeding season was twice a week. We used for this study two ejaculates from each male, collected 15 days apart from each other. Semen was transported to the AGRIS laboratory within 5 min after collection, and it was immediately processed. Sperm concentration was evaluated by NucleocounterSp - 100 Chemometech. Thereafter, semen was diluted up to 50×10^6 spermatozoa/mL with a commercial media for liquid storage (Kenney's extender, IMV Technologies). Ejaculates from each stallion were kept separated throughout all experimental procedures and, once diluted, they were placed in two separated Falcon tubes and transported to the UNISS laboratory under controlled temperature (4°C) within 1 hr. Upon arrival, one sample from each stallion was allocated to the treated and untreated group. The experimental groups were placed in two refrigerators at 4°C and kept there for 72 hrs. The REAC device was placed in the refrigerator where treated samples were stored, and it was set at 2.4 GHz, and its conveyor electrodes were immersed into the semen liquid storage media.

Experimental design

In order to evaluate the effects of REAC technology during stallion semen liquid storage, a battery of analyses was performed. The parameters analyzed included different semen molecular and cellular features, measured before and during REAC

treatment, such as viability, motility parameters, acrosome status, and DNA integrity. In addition, the oxidative status was assessed by determining lipid peroxidation, the activity of superoxide dismutase (SOD), and the total antioxidant capacity. These analyses were performed on sub-samples of cooled semen collected at 0, 24, 48, and 72 hrs. after the beginning of the REAC treatment. Each analysis was replicated 3 times.

Viability and motility parameters assessment

In vitro viability was assessed by eosin-nigrosin stain. Briefly, the eosin-nigrosin solution was prepared as described by Pintado et al.[23]. Briefly, 10 g nigrosin was dissolved in distilled water by boiling, and filtered into a cylinder containing 0.7 g eosin, 7.5 ml of 50 mmol glucose l-1, and 7.5 ml tartrate phosphate buffer (TPB) (50 mM Na₂HPO₄ l-1, 25 mM KH₂PO₄ l-1, 77 mM potassium sodium tartrate l-1), and the volume made up to 100 mL. The solution was kept at 5°C. Staining was carried out by mixing an aliquot of spermatozoa suspended in saline medium with eosin-nigrosin solution (1:3 dilution) for 30 s before preparing a smear and drying on a warm plate at 37°C. At least 200 cells were counted for each slide. Sperm motility parameters were assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system (Sperm Class Analyser, S.C.A. v 3.2.0, Microptic S.L., Barcelona, Spain) with setting of 25 frames acquired to avoid sperm track overlapping, minimum contrast 10, minimum velocity of average path 30 µm/s, progressive motility > 80% straightness. This system has a specific set-up for stallion sperm evaluation. In particular, it was set up as follows: minimum contrast – 70; low and high static size gates – 0.6–4.32; low and high intensity gates – 0.20–1.92; low and high elongation gates 7–91; default cell size – 10 pixels; default cell intensity –80. For each sample, 5 µL subsample of sperm suspension was loaded into a pre-warmed analysis chamber with a depth of 10 µm (Makler Counting chamber, Sefi-Medical Instruments Ltd., BiosigmaS.r.l., Italy) and a minimum of 500 sperms per subsample were analyzed in at least four different

microscopic fields. Sperm motility was assessed at 37°C at 40 × using a phase contrast microscope.

The parameters evaluated included: percentage of progressive motile spermatozoa (PM); percentage of rapid spermatozoa (rapid); average path velocity (VAP, mm/s; the average velocity of the smoothed cell path); curvilinear velocity (VCL, mm/s; the average velocity measured over the actual point to point track followed by the cell); straight-line velocity (VSL, mm/s; the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track); linearity index (LIN, %; the average value of the ratio VSL/VCL); straightness index (STR, %; the average value of the ratio VSL/VAP); amplitude of lateral head displacement (ALH, mm; the mean width of the head oscillation as the sperm swim); beat cross-frequency (BCF, Hz; the frequency of sperm head crossing the average path in either direction); wobble (WOB; $VAP/VCL \times 100$, %; a measure of the oscillation of the actual trajectory about its spatial average path).

Acrosome integrity

Acrosome integrity was evaluated by incubating spermatozoa with fluorescein isothiocyanate labeled *Pisum Sativum* agglutinin (FITC-PSA). The aliquots of sperm suspension were incubated for 15 min at 39°C with FITC-PSA (5 µg/mL in phosphate buffered saline [PBS], pH 7.4), and propidium iodide (PI; 14 µg/mL in phosphate buffered saline [PBS], pH 7.4). In order to reduce background fluorescence, unbound PSA and PI were removed by adding 200 µL of PBS and spermatozoa were washed by centrifugation in a micro centrifuge at 800 g for 2 min. The supernatant was aspirated and the pellet re-suspended in 100 µL of PBS. After washing, a 10 µL sample was put on a slide and cover slipped. The slide was immediately dried by leaving at 37°C for 10 min for immobilization of sperm cells. To evaluate the stained sperm cells, at least 200 cells were counted in duplicate for each sample, using a Diaphot (Nikon, Japan) epifluorescence microscope. Spermatozoa with intact plasma membrane and intact

acrosome were PI and FITC-PSA negative, those with intact plasma membrane and damaged acrosome were PI negative and FITC-PSA positive, those with damaged plasma membrane and intact acrosome were PI positive and FITC-PSA negative, and finally those with damaged plasma membrane and damaged acrosome were PI and FITC-PSA positive.

DNA integrity assessment

DNA damage was assessed by single-cell gel electrophoresis (comet assay). Analysis of the shape and length of "comet" tail, just like the DNA content in the tail, gives an assessment of DNA damage. The neutral comet assay allows the detection of double-strand breaks by subjecting lysed cell nuclei to an electrophoretic field at neutral pH[24], here performed according to the method described by Sakkas et al.[25], with slight modifications. Briefly, sperm suspension (30 μ L) was diluted in low-melting-point agarose at 37°C (80 μ L; 1% w/v). A 100- μ L mixture of sperm-agarose was immediately pipetted onto 1% w/v normal-melting-point agarose-coated slides. Slides were immersed in ice-cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X, and 10 mM dithiothreitol [DTT]; pH = 10) for 1 h at 4°C. Slides were then immersed in lysing solution supplemented with proteinase K (10 μ g/mL). Incubation was performed during 1 h at 37°C. After this step, slides were rinsed in PBS and then placed in a horizontal electrophoresis tank filled with freshly prepared electrophoresis neutral buffer (Tris-acetate-EDTA [TAE], pH 7.3). Electrophoresis was performed at 10 V and 6 mA for 20 min. Following electrophoresis, the slides were neutralized with Tris-HCl buffer (pH 7.5) for 5 min and then fixed in methanol.

Slides were stained with propidium iodide (PI), mounted with a coverslip and analysed under an epifluorescence microscope. Digital comet images were captured with an Olympus microscope equipped with a CCD camera and Olympus CellF software. Fifty comets were measured per replicate sample (i.e., slide circle) using Comet Score software (TriTek Corp., Sumerduck, Virginia, USA). Scored parameters included

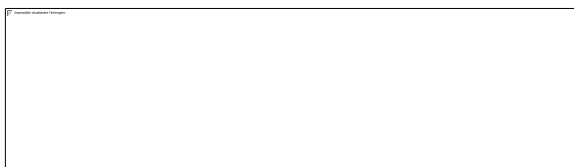
percentages of head and tail DNA (a measurement of the proportion of total DNA that is present in the comet head and tail).

Sample preparation for the oxidative parameters analysis.

Five mL of semen samples (50×10^6 spermatozoa/mL) was centrifuged at 1500 g for 10 minutes. The obtained pellets were treated for cellular extraction with PBS containing 0,1% Triton X-100 (500 μ L of PBS-Triton X-100 0,1% every 250×10^6 total spermatozoa). Malondialdehyde concentration (MDA) and superoxide dismutase (SOD) activity were assayed in cellular extracts, while trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was determined in both cellular extracts and extracellular supernatants.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was measured enzymatically as a decrease of the XTT (3'-(1-[(Phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium)-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulphonic acid hydrate) reduction by superoxide anion generated by xanthine oxidase[26].



SOD activity was assessed as the competition between reaction c and b which is measured as a decrease of the rate of XTT reduced. The reaction mixture contained 40.5 mM sodium phosphate buffer pH 7.8; 15 mM xanthine; EDTA 12,5mM; XTT 30 mM and 50 μ L of sample to complete a final volume of 500 μ L. The reaction was initiated by the addition of xantine oxidase (XO) (0.15 mUI) and the absorbance change at 470 nm was monitored each one minutes for 3 minutes total with a Hitachi

spectrophotometer (U-2000). The values of SOD in the samples were expressed in U/mL and calculated using a standard curve (0,065-0,8 U/ml). One enzyme unit (IU) is defined as the amount of SOD capable of transforming 1.0 mmole/min of O₂•⁻

Quantification of lipid peroxidation end products: malondialdehyde (MDA)

MDA, one of the several low-molecular-weight end-products of LPO, was evaluated by the TBARS assay using thiobarbituric acid and a spectrophotometric method according to the TBA test described by Spanier and Traylor [27], with some modifications. 100 µL of each sample (cell extract and extracellular supernatant) were added to 100 µL glacial acetic acid 33%, 75 µL SDS 10%, 100 µL Tris-HCl 50 mM pH 7,4 and 250 µL TBA 0,75%. The mixture was then incubated for 1 hour at 100°C and immediately cooled on ice. After 10 minutes 200 µL of acetic acid 33% were added and samples were centrifuged for 20 minutes at 7000 g. The supernatant absorbance was then read with Thermo Electron Corporation Genesys 10UV spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Rodano, Milano, Italy), at 535 nm. The values of MDA in the samples were expressed in µM units and calculated using a standard curve.

Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

Cell extract and extracellular supernatant antioxidant capacity was determined using the method described by Re et al.[28], and modified by Lewinska et al[29]. Briefly, a fresh solution was prepared by dissolving 19.5 mg 2,20-azinobis (3-ethylbenzthiazoline -6-sulphonic acid [ABTS]) and 3.3 mg potassium persulphate in 7 mL of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. This solution was stored in the dark for 12 hours for completion of the reaction. ABTS solution was diluted (usually approximately 1:80) in 0.1 mol/L phosphate buffer, pH 7.4, to give an absorbance reading at 734 nm of 1.0. The absorbance of the mixture was measured twice in a

spectrophotometer (ThermoElecrom Corporation Genesys 10 UV, Madison, Wisconsin, USA), at 734 nm, 3 minutes after mixing a sample with the ABTS•⁻ solution. The extent of ABTS•⁻ bleaching is proportional to the activity of antioxidants in a given sample. The antioxidant capacity was expressed as TEAC, the concentration of trolox producing the same effect as the sample studied.

The values of TEAC in the samples were calculated using a standard curve (5–20 mMtrolox in a total volume of 550 mL) and were expressed as mMtrolox equivalent for extracellular supernatant and nmoli of trolox equivalent/10⁹ spermatozoa for cell extract.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the statistical software program Statgraphic Centurion XV (version15.2.06 for Windows; Stat Point Technologies Inc., Warrenton, VA, USA), and a probability of $p < 0.05$ was considered to be the minimum level of significance. Data are expressed as mean \pm S.E. Differences in sperm parameters between the experimental groups at the different time points (hours of treatment) were assessed by general lineal model where: $Y = \mu + \text{hours of treatment} + \text{group} + \text{hours of treatment} \times \text{group} + \text{stallions}$. Hours of treatment and group were considered fixed factors and stallions a random factor. The method used to discriminate between the means was Fisher's least-significant-difference (l.s.d.) procedure. The probabilities obtained by the l.s.d. test were corrected by Bonferroni's correction for multiple comparisons. Data were normally distributed (Shapiro Wilk W test: $P > 0.05$).

Results

Viability

As for viability, significant individual differences were observed among the 8 stallions in many kinetic parameters studied (VCL, STR, LIN, WOB, and ALH). The storage conditions under which sperm cells were maintained proved to preserve spermatozoa

viability for at least 72 hrs. No difference was observed in the number of vital spermatozoa assed by eosin dye exclusion in REAC treated samples and untreated controls (Figure 1). The male factor was indeed the only factor able to influence spermatozoa viability, as outlined by the significant difference observed among the eight stallions (Figure 1, panel B).

Kinetic parameters and straightness index

In general, kinetic parameters decreased significantly during the 72 hrs. of observation, and no significant differences were observed between REAC treated samples and untreated controls (Figure 2). Interestingly, the straightness index values were significantly higher in REAC treated samples compared to untreated controls (figure 2, panel A and B; $p < 0.001$).

Acrosome membrane integrity

Acrosome membrane integrity was better preserved in REAC treated spermatozoa compared to untreated controls, as demonstrated by the higher percentage of spermatozoa showing an intact acrosome after FITC-PSA staining, and by the corresponding lower percentage of spermatozoa with damaged acrosome ($p < 0.001$; figure 3, panels A, C, D and F). This difference was observed both in the mean values, and in values recorded after 48 and 72 hrs. of cold storage. As for the other parameters, acrosome integrity decreased over time with a similar pattern in both experimental groups. In this case, however, individual differences among the eight stallions did not reach statistical significance. REAC treatment had a beneficial effect in maintaining spermatozoa DNA integrity, as evaluated by the comet assay (figure 4). A significantly smaller comet area (figure 4, panel A; $p < 0.0001$), together with a higher percentage of DNA in the head of the spermatozoa (figure 4, panel B; $p < 0.0001$), was found in REAC treated spermatozoa compared to untreated controls. As shown in panels E and F (figure 4), this protective effect was evidenced after 24 hrs. of REAC

treatment. Significant individual differences were observed among the eight stallions in both comet area and percentage of DNA in the head (figure 4, panels C and D; $p>0.01$). The analysis of the oxidative status during the 72 hrs. of cold storage indicated that REAC treatment had a positive effect on the enzymatic defense system of stallion spermatozoa. In particular, the mean activity of the intracellular SOD was significantly higher in REAC treated spermatozoa compared to untreated controls (figure 5, panel A; $p<0.05$). This difference was likely linked to the marked increase in the enzyme activity observed after 48 hrs. of treatment in REAC treated spermatozoa compared to untreated controls (figure 5, panel E; $p<0.05$). The increase in the intracellular antioxidant defenses of the REAC treated spermatozoa was indirectly confirmed by the significant decreased in the intracellular concentration of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation. In particular, while mean values did not differ between the two experimental group, in REAC treated spermatozoa the intracellular concentration of MDA, after an initial rise at 24 hrs., dropped to values significantly lower compared to the untreated controls by 72 hrs. of storage (figure 5, panels B and F; $p<0.001$). Both SOD and MDA intracellular concentration differed significantly among the eight stallions studied. The positive effect of REAC treatment on spermatozoa oxidative status was also supported by the higher trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) found in both the cellular extract (figure 6, panel A; $p<0.05$) and the storage media of REAC treated spermatozoa compared to untreated controls (figure 6, panel B; $p<0.0001$). In particular, the antioxidant capacity of the storage media rose significantly during the first 24 hrs. of REAC treatment, and then remained at higher values compared to untreated controls for the entire observational period (figure 6, panel F; $p<0.001$). The stallion effect influenced significantly only the TEAC values of the cellular extract ($p>0.0001$), while it was not observed for values recorded in the storage media (figure 6, panels C and D).

Discussion

The kinetic parameter significantly affected by REAC treatment was spermatozoa straightness index, i.e. the average value of the ratio straight-line velocity/average path velocity, which proved to be better preserved following REAC treatment. This parameter expresses the finalization of spermatozoa towards their fertilization task. In fact, sperm motility is essential for normal fertilization, but in particular the orientation of motility and the motor strategy of spermatozoa are crucial features. Among the cellular features analyzed, acrosome integrity proved to be significantly influenced by REAC treatment. In particular, the mean percentage of spermatozoa with intact acrosome was higher in REAC treated spermatozoa compared with untreated controls. Analyzing the variation of this parameter during the 72 hrs. of storage, emerged that REAC treatment was effective after 48 hrs. of storage, as evidenced by the higher percentages of spermatozoa with intact acrosome at 48 and 72 hrs. Considering that no differences were found in semen viability during storage, the percentage of spermatozoa with damaged acrosome was higher in untreated samples compared with REAC treated ones. The acrosome is a Golgi-derived organelle that stores enzymes for sperm penetration. It is thus necessary for the fertilization process to occur, and a damaged acrosome results inevitably with the loss of the fertilizing ability. The preservation of acrosome membrane integrity in REAC treated spermatozoa was also accompanied by a higher DNA integrity, as revealed by the lower DNA migration after single cell electrophoresis. Even if this parameter was subjected to high inter-individual variations, comet area was significantly larger in untreated controls, the percentage of migrating DNA being higher than in REAC treated spermatozoa. Analyzing the changes in these parameters during storage revealed that REAC beneficial effect on DNA integrity became evident after 24 hrs. of REAC treatment.

DNA damage in refrigerated cells may be caused by an increase in intracellular sodium concentration, which is detrimental to the nucleus and DNA[18, 19], considering that at low temperature the activity of the sodium-potassium-dependent ATPase is impaired and this can result in uptake of sodium ions from extracellular milieu. Thus, in this study we observed the beneficial effect of REAC treatment as cell polarity optimizer on the preservation of spermatozoa DNA integrity, related to its positive regulation of ion flows and cell bioelectric activity.

In addition, the preservation of both acrosome membrane and DNA integrity in REAC treated spermatozoa can be mediated by the observed effect in enhancing sperm antioxidant defenses. Antioxidants play a crucial role in minimizing oxidative damage in the spermatozoa. The metalloproteins SOD are an important antioxidant defense in nearly all cells exposed to oxygen. SOD, together with glutathione (GSH), is one of the most important intracellular scavenger systems spermatozoa have; it reduces the superoxide anion (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2)[30]. The results of this study evidenced that SOD activity in REAC treated spermatozoa peaked at 48 hrs. of storage and was significantly higher compared to untreated controls. This higher SOD activity was accompanied by a significant decrease over time in intracellular concentration of lipid peroxidase end products (MDA), whose levels at 72 hrs. of storage were lower in REAC treated spermatozoa compared with untreated controls. In addition, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of both cellular extract and storage media was significantly higher in REAC treated samples compared with untreated controls.

Oxidative stress adversely changes sperm cell functions, by ultimately endangering cell survival, and causes loss of sperm motility, viability and capacity for fertilization[31].

The limited volume and restricted location of their cytoplasmic space place constraints on the availability of intracellular antioxidant enzymes in these cells. In addition, the susceptibility of spermatozoa to oxidative stress is a consequence of the superabundance of polyunsaturated fatty acids in their plasma membrane, whose

presence gives the membrane the fluidity and flexibility needed to engage in membrane fusion events associated with the fertilization. Unfortunately, the presence of double bonds in these molecules makes them vulnerable to free radical attacks and the initiation of lipid peroxidation (LPO) cascade. These attacks ultimately lead to the impairment of sperm function through oxidative stress and the production of cytotoxic aldehydes, such as MDA [32]. ROS can also attack another important substrate in mammalian spermatozoa: the DNA present in the sperm nucleus[33]. Experimental studies revealed that oxidative stress results in DNA strand breaks in spermatozoa, as detected by the comet assay [34, 35]. Even if it is tightly compacted with protamines, and further stabilized by the creation of inter- and intra-molecular disulphide bonds [34, 36], free radicals can still attack it, engaging in H-abstraction reactions with the ribose unit and inducing the formation of DNA base adducts. Both of these processes greatly destabilize the DNA structure and ultimately result in the formation of DNA strand breaks[33].

For these reasons, oxidative stress of spermatozoa is a main factor in the determination of male infertility. Electron leakage from the sperm mitochondria is thought to constitute the major source of reactive oxygen species (ROS) in spermatozoa [21]. A perturbation in the electron transport chain and the loss of membrane potential are associated with a significant increase in ROS generation [21, 22]. Thus, we can speculate that the enhancement of sperm antioxidant defenses in REAC treated samples may be mediated by a protective effect on the preservation of mitochondria membrane potential.

In conclusion, the present study demonstrated that REAC treatment, while not affecting sperm viability and motility during refrigeration, preserves spermatozoa acrosome membrane and DNA integrity. This effect is likely to be mediated by the enhancement of sperm antioxidant defenses after REAC treatment, as evidenced by the higher SOD activity, the lower MDA intracellular concentration at the end of the treatment, and the higher antioxidant capacity of the cell extract and the culture

medium. As suggested by other studies, any mean aimed at enhancing sperm antioxidant defenses has an important therapeutic role to play in the clinical management of male infertility [31]. Thus, this study set the basis for the use of REAC protocols aimed at enhancing the spermatozoa ability to withstand the oxidative stress related with Assisted Reproductive Technology (ART) processing.

The present study demonstrated that REAC treatment during liquid storage of chilled stallion spermatozoa preserves sperm antioxidant defenses, and as a result allows acrosome membrane and DNA integrity to be maintained longer than in untreated controls. While the loss of acrosome membrane integrity results in an impairment in spermatozoa fertilizing ability, DNA damage in the male germ line is a major contributor to infertility, miscarriage and birth defects in the offspring [37]. Thus, this technology has promising application in the in vitro treatment of sperm cells during ART processing.

Figure legende

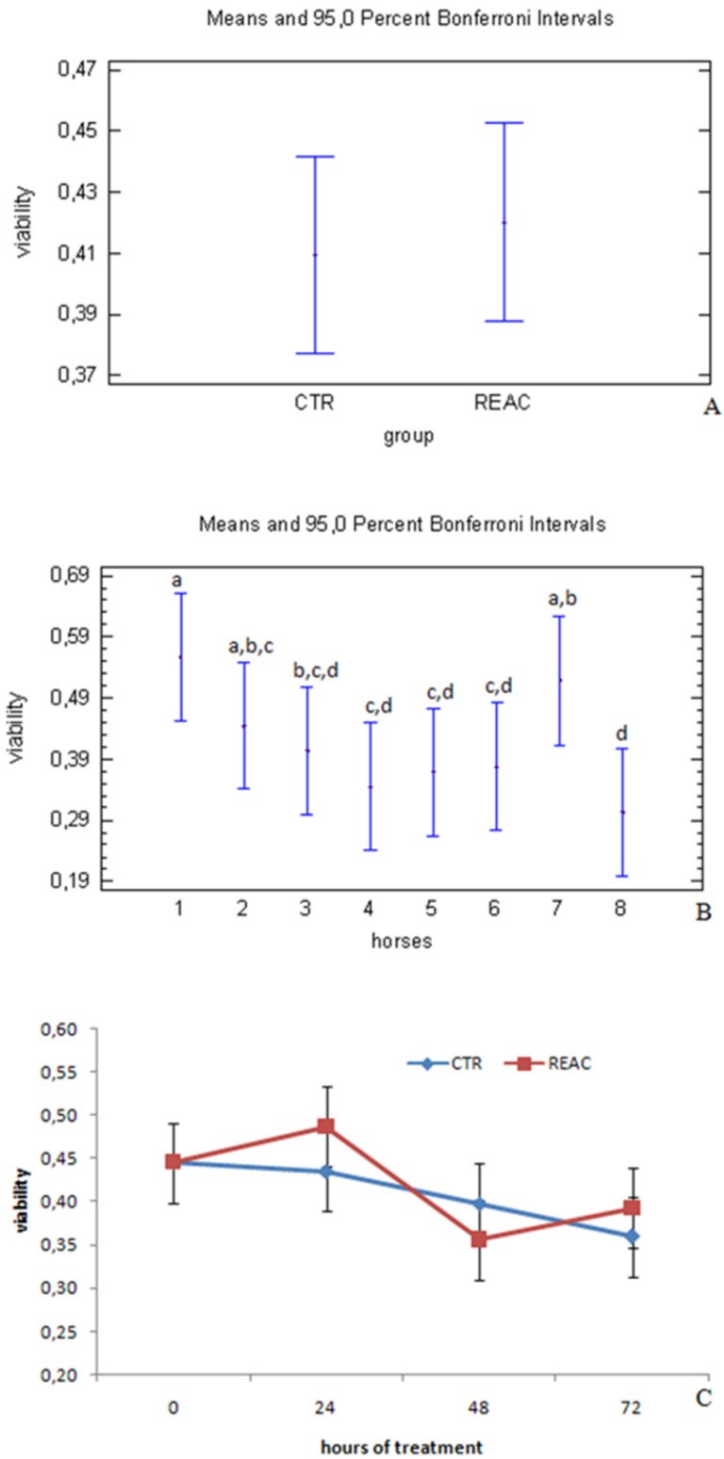
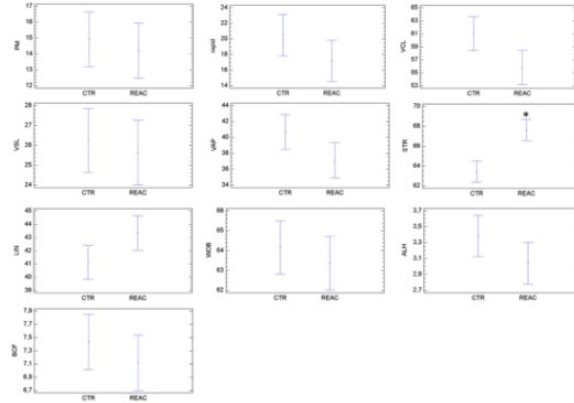


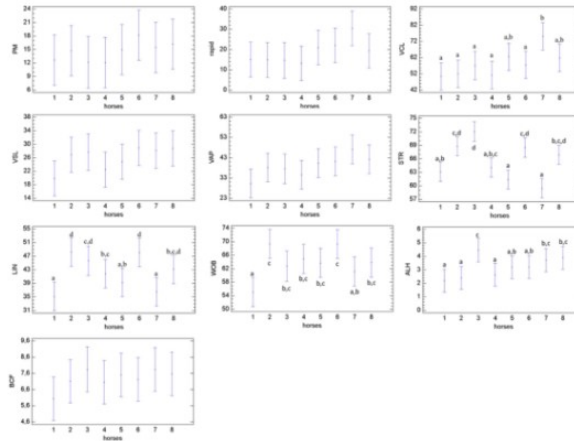
Figure 1

Effect of REAC treatment on stallion spermatozoa viability, expressed as number of viable cells/total cells counted, during 72 hrs. of storage at 4°C. Panel A and B show the mean and 95,0 Bonferroni intervals per group and per stallion, while panel C shows the mean \pm S.E. values determined at the different time points. A total of 16 ejaculates collected from 8 stallions of different breeds (1: Thoroughbred; 2, 3, 4, 6: Arabian; 5, 7, 8: Warmblood) were used. a,b,c,d Different letters indicate a statistical difference among the ejaculates collected from the 8 stallions (General Linear Model): $p > 0.01$.

A



B



C

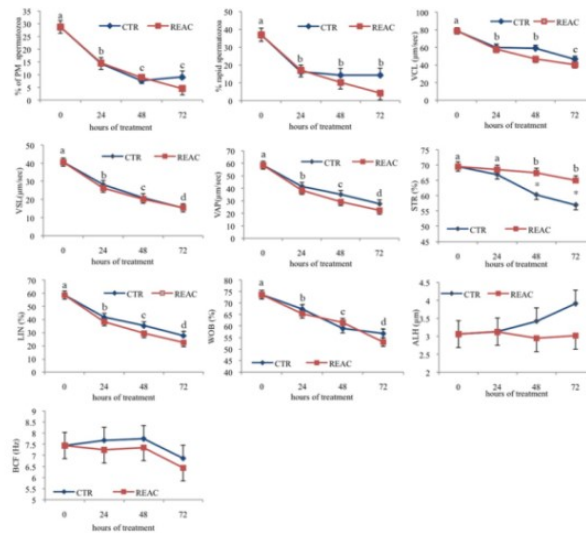


Figure 2

Effect of REAC treatment on the kinetic parameters of stallion spermatozoa during 72 hrs. of storage at 4°C. Panel A and B show the mean and 95,0 Bonferroni intervals per group and per stallion, while panel C shows the mean \pm S.E. values determined at the different time points. A total of 16 ejaculates collected from 8 stallions of different breeds (1: Thoroughbred; 2, 3, 4, 6: Arabian; 5, 7, 8: Warmblood) were used. PM: percentage of progressive motile spermatozoa; Rapid: percentage of rapid spermatozoa; VAP: average path velocity (mm/s; the average velocity of the smoothed cell path); VCL: curvilinear velocity (mm/s; the average velocity measured over the actual point to point track followed by the cell); VSL: straight-line velocity (mm/s; the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track); LIN: linearity index (%; the average value of the ratio VSL/VCL); STR: straightness index (%; the average value of the ratio VSL/VAP); ALH: amplitude of lateral head displacement (mm; the mean width of the head oscillation as the sperm swim); BCF: beat cross-frequency (Hz; the frequency of sperm head crossing the average path in either direction); WOB: wobble ($VAP/VCL \times 100$, %; a measure of the oscillation of the actual trajectory about its spatial average path).

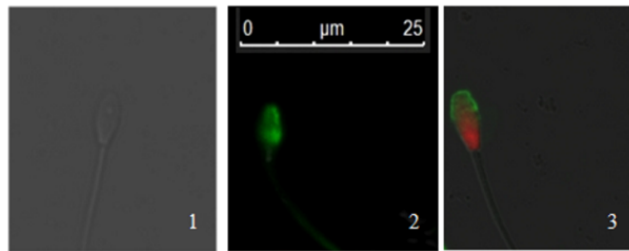
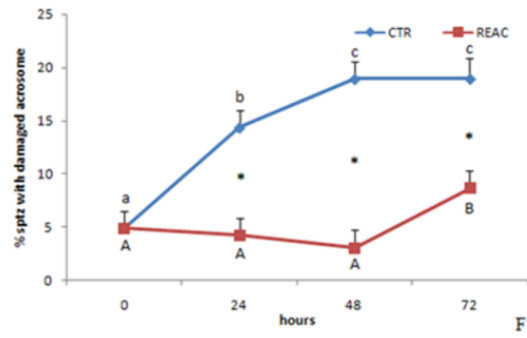
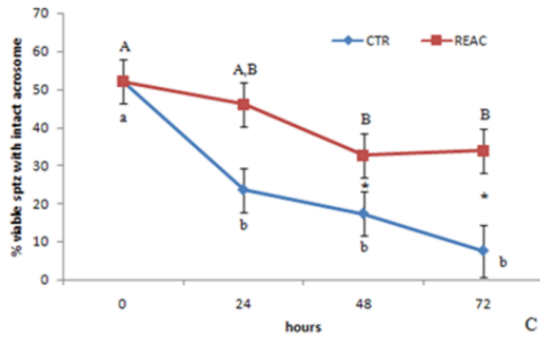
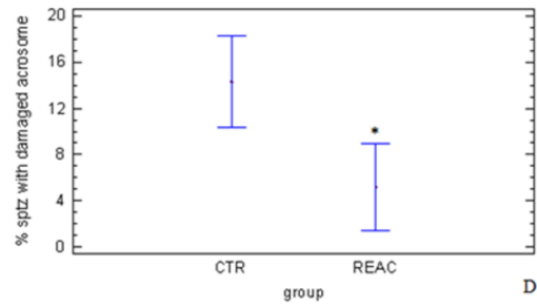
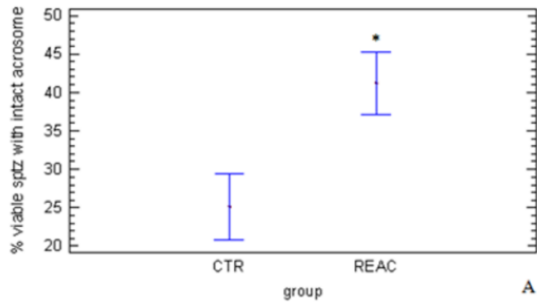


Figure 3

Effect of REAC treatment on acrosome integrity, as evaluated by FITC-PSA staining, of stallion spermatozoa during 72 hrs. of storage at 4°C. Panels A,B, D and E show the mean and 95,0 Bonferroni intervals per group and per stallion, while panels C and F shows the mean \pm S.E values determined at the different time points. Right panels show the percentage of spermatozoa with intact acrosome, while left panels show the percentage of spermatozoa with damaged acrosome. A total of 16 ejaculates collected from 8 stallions of different breeds (1: Thoroughbred; 2, 3, 4, 6: Arabian; 5, 7, 8: Warmblood) were used. The microscopic images show a live spermatozoon with intact acrosome (1), a live spermatozoon with damaged acrosome (2), and a dead spermatozoon with damaged acrosome (3), identified using fluorescein isothiocyanatelabeled *Pisum Sativum* agglutinin (FITC-PSA) and propidium iodide (PI). Asterisks indicate statistical differences between REAC treated and untreated controls (General Linear Model): $p > 0.001$. Different letters indicate a statistical difference among values recorded at the different time points within the same experimental group (General Linear Model): $p > 0.01$. Upper case letters: REAC group; lower case letters: control group.

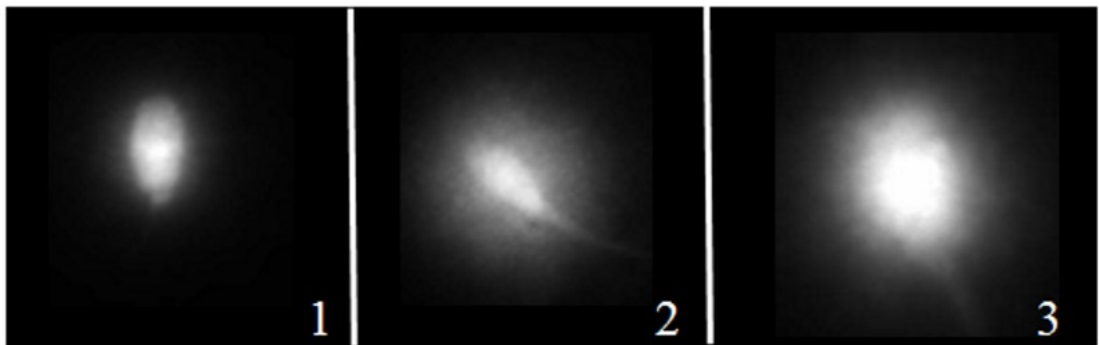
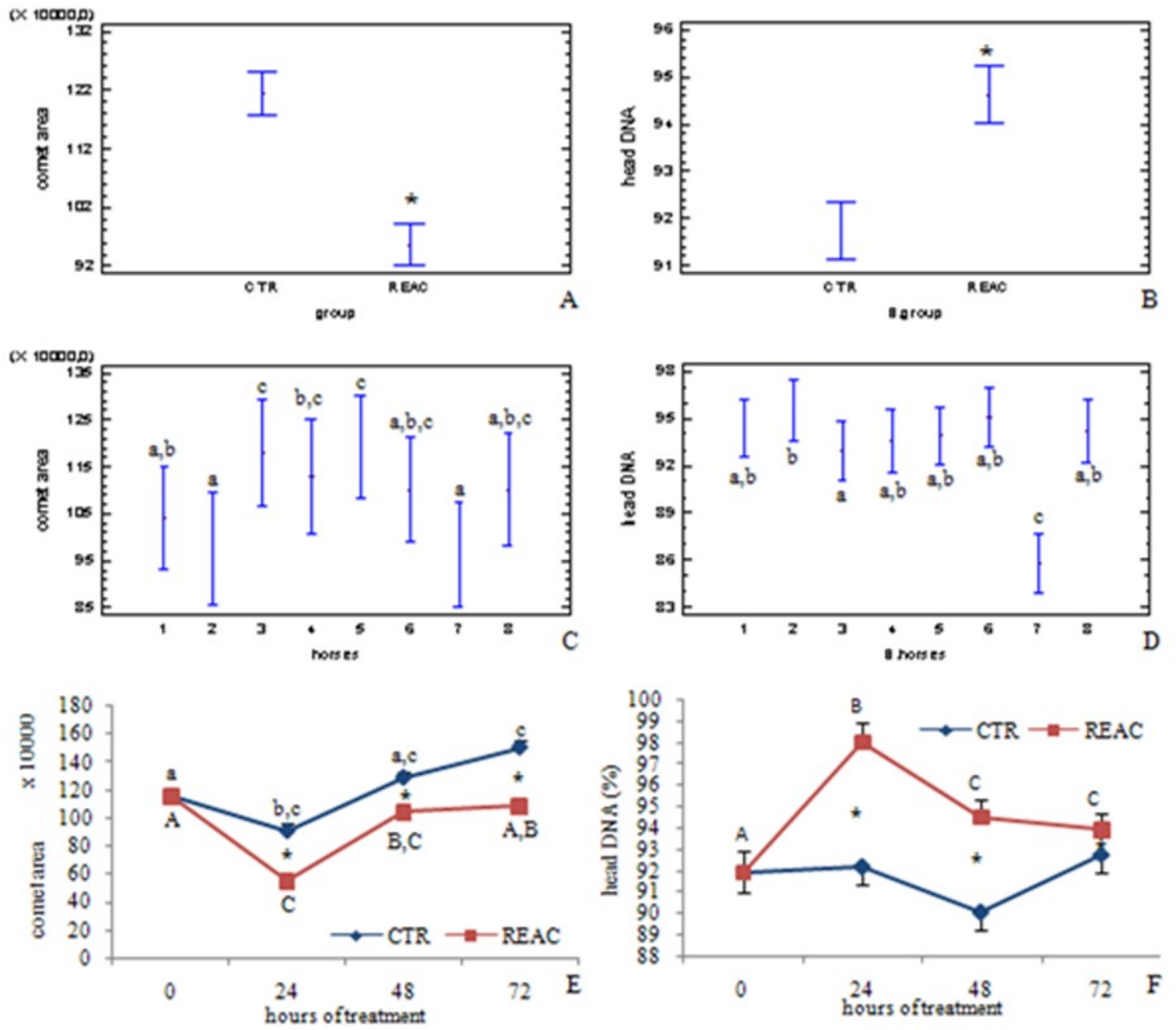


Figure 4

Effect of REAC treatment on DNA integrity, as evaluated by the neutral comet assay, of stallion spermatozoa during 72 hrs. of storage at 4°C. Evaluated parameters included the comet area (pixels) and the percentage of DNA in the head. For each parameter, panel A - D show the mean and 95,0 Bonferroni intervals per group and per stallion, while panels E and F show the mean \pm S.E values determined at the different time points. A total of 16 ejaculates collected from 8 stallions of different breeds (1: Thoroughbred; 2, 3, 4, 6: Arabian; 5, 7, 8: Warmblood) were used. Images show representative comets following application of the neutral comet assay: (1) non-fragmented sperm nucleus; (2-3) fragmented sperm nuclei.

Asterisks indicate statistical differences between REAC treated and untreated controls (General Linear Model): $p > 0.01$. Different letters indicate a statistical difference among values recorded at the different time points within the same experimental group (General Linear Model): $p > 0.01$. Upper case letters: REAC group; lower case letters: control group.

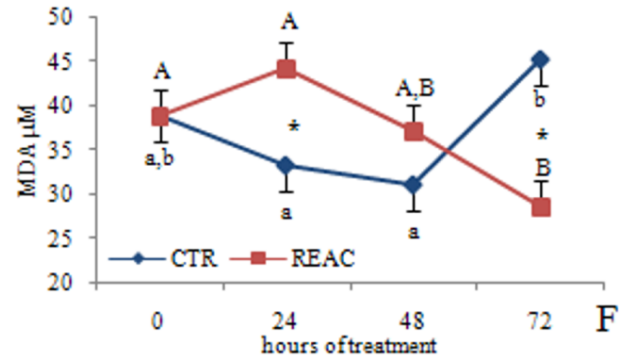
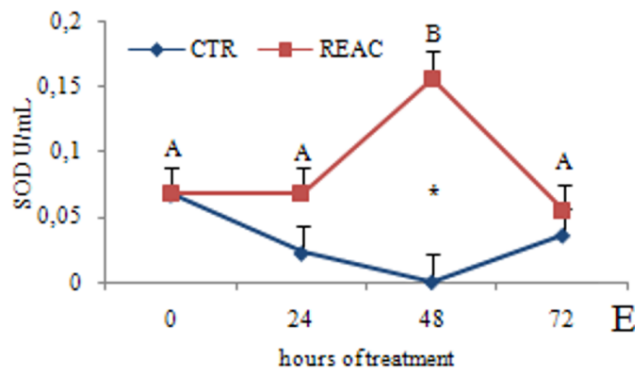
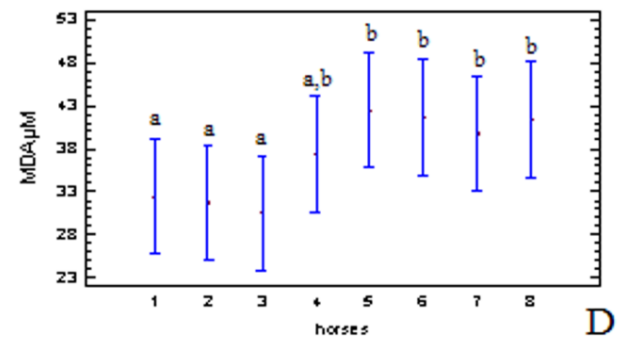
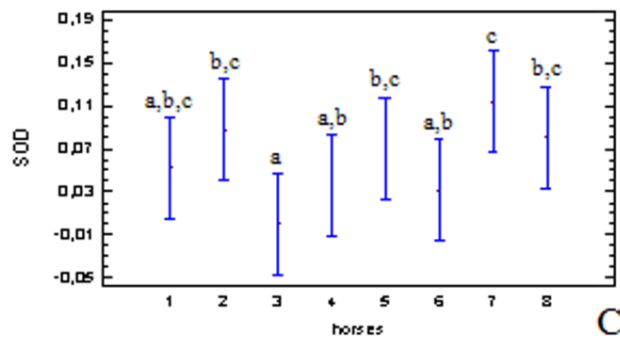
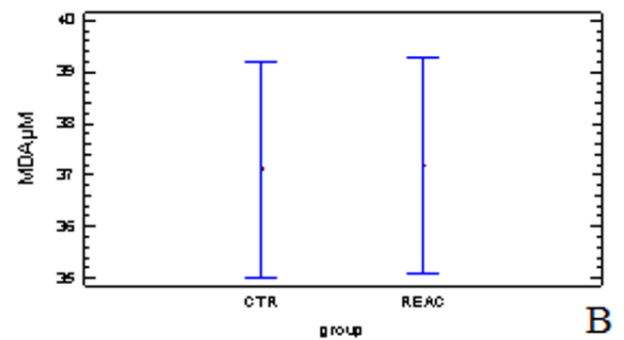
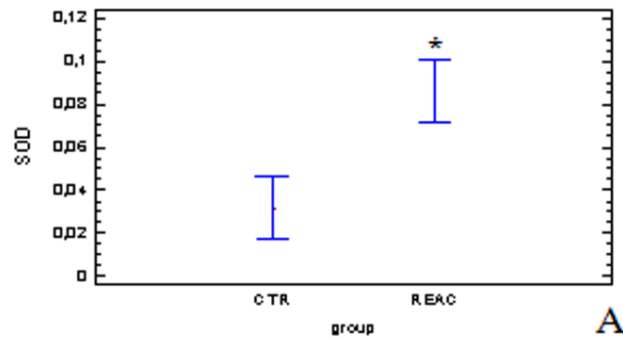


Figure 5

Effect of REAC treatment on SOD (left side) and MDA (right side) intracellular concentrations of stallion spermatozoa during 72 hrs. of storage at 4°C. For each parameter, panel A - D show the mean and 95,0Bonferroni intervals per group and per stallion, while panels E and F show the mean \pm S.E values determined at the different time points. A total of 16 ejaculates collected from 8 stallions of different breeds (1: Thoroughbred; 2, 3, 4, 6: Arabian; 5, 7, 8: Warmblood) were used. Asterisks indicate statistical differences between REAC treated and untreated controls (General Linear Model): $p > 0.05$.

Different letters indicate a statistical difference among horses and among values recorded at different time points within the same experimental group (General Linear Model): $p > 0.01$. Panels E and F: upper case letters: REAC group; lower case letters: control group.

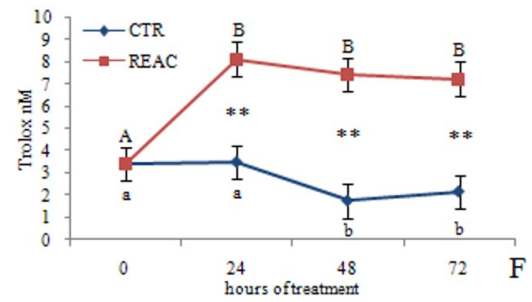
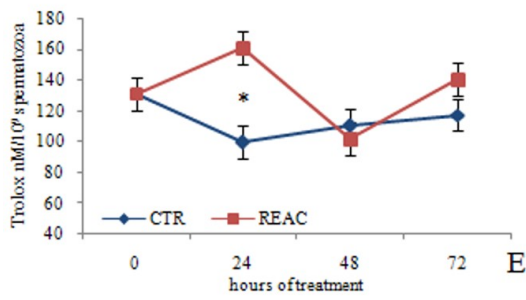
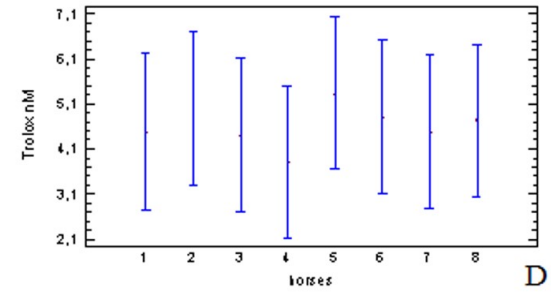
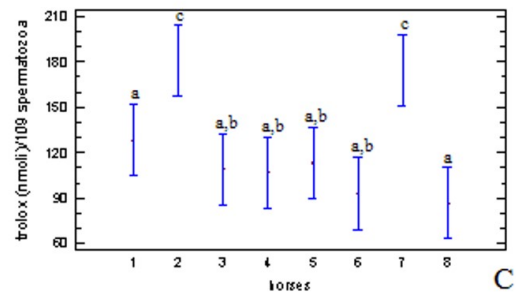
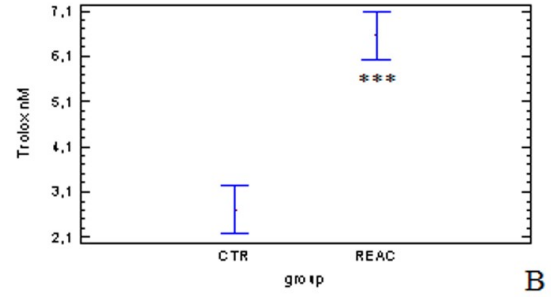
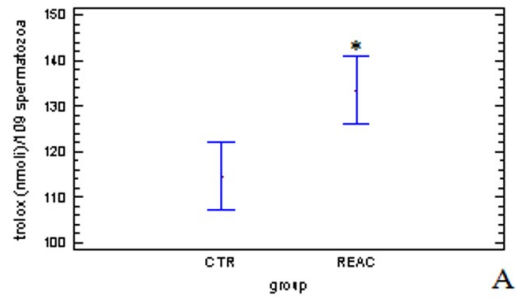


Figure 6

Effect of REAC treatment on TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) in the cellular extract of stallion spermatozoa (left side) and in the media during 72 hrs. of storage at 4°C. For each parameter, panel A - D show the mean and 95,0 Bonferroni intervals per group and per stallion, while panels E and F show the mean \pm S.E values determined at the different time points. A total of 16 ejaculates collected from 8 stallions of different breeds (1: Thoroughbred; 2, 3, 4, 6: Arabian; 5, 7, 8: Warmblood) were used.

Asterisks indicate statistical differences between REAC treated and untreated controls (General Linear Model): * $p > 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Different letters indicate a statistical difference among horses and among values recorded at the different time points within the same experimental group (General Linear Model): Panel C: $p > 0.0001$. Panel F: $p < 0.001$. Upper case letters: REAC group; lower case letters: control group.

References

1. Maioli M., Rinaldi S., Migheli R., Pigliaru G., Rocchitta G., Santaniello S., Basoli V., Castagna A., Fontani V., Ventura C., Serra P.A. Neurological morphofunctional differentiation induced by REAC technology in PC12. A neuro protective model for Parkinson's disease. *Scientific reports* 2015, 5:10439.
2. Maioli M., Rinaldi S., Pigliaru G., Santaniello S., Basoli V., Castagna A., Fontani V., Ventura C. REAC technology and hyaluron synthase 2, an interesting network to slow down stem cell senescence. *Scientific reports* 2016, 6:28682.
3. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Delitala A., Bianchi F., Tremolada C., Fontani V., Ventura C. Radioelectric asymmetric conveyed fields and human adipose-derived stem cells obtained with a nonenzymatic method and device: a novel approach to multipotency. *Cell transplantation* 2014, 23:1489-1500.
4. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Delitala A., Margotti M.L., Bagella L, Fontani V, Ventura C. Anti-senescence efficacy of radio-electric asymmetric conveyer technology. *AGE* 2013.
5. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Cavallini C., Fontani V., Ventura C. Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages. *Cell transplantation* 2013, 22:1227-1235.
6. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Fontani V., Ventura C. Radiofrequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool for improving tissue regeneration. *Cell transplantation* 2012, 21:1225-1233.
7. Rinaldi S., Maioli M., Pigliaru G., Castagna A., Santaniello S., Basoli V., Fontani V., Ventura C. Stem cell senescence. Effects of REAC technology on telomerase-independent and telomerase-dependent pathways. *Scientific reports* 2014, 4:6373.

8. Rinaldi S., Maioli M., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Margotti ML., Carta A, Fontani V, Ventura C. Regenerative treatment using a radioelectric asymmetric conveyor as a novel tool in antiaging medicine: an in vitro beta-galactosidase study. *Clinical Interventions in Aging* 2012, 7:191-194.
9. Flesch F.M., Gadella B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1469:197-235.
10. Said T.M., Gaglani A., Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online* 2010, 21:456-462.
11. Khalifa T., Lymberopoulos A. Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell and tissue banking* 2013, 14:687-698.
12. Ortega Ferrusola C., Gonzalez Fernandez L., Morrell J.M., Salazar Sandoval C., Macias Garcia B., Rodriguez-Martinez H., Tapia J.A., Pena F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 2009, 138:55-63.
13. Almeida J., Ball B.A. Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal reproduction science* 2005, 87:321-337.
14. Ortega Ferrusola C., Gonzalez Fernandez L., Macias Garcia B., Salazar-Sandoval C., Morillo Rodriguez A., Rodriguez Martinez H., Tapia J.A., Pena F.J. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biology of reproduction* 2009, 81:1106-1111.
15. Ball B.A., Vo A.T., Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American journal of veterinary research* 2001, 62:508-515.

16. Aitken R.J., Lambourne S., Gibb Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiology—Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34:17-27.
17. Riel J.M., Yamauchi Y., Huang T.T., Grove J., Ward M.A. Short-term storage of human spermatozoa in electrolyte-free medium without freezing maintains sperm chromatin integrity better than cryopreservation. *Biology of reproduction* 2011, 85:536-547.
18. Suzuki K., Yanagida K., Yanagimachi R. Comparison of the media for isolation and storage of round spermatid nuclei before intracytoplasmic injection. *Journal of assisted reproduction and genetics* 1998, 15:154-157.
19. Tateno H., Kimura Y., Yanagimachi R. Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biology of reproduction* 2000, 63:341-346.
20. Levin M. Endogenous bioelectrical networks store non-genetic patterning information during development and regeneration. *The Journal of physiology* 2014, 592:2295-2305.
21. Koppers A.J., De Iuliis G.N., Finnie J.M., McLaughlin E.A., Aitken R.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2008, 93:3199-3207.
22. Burlaka A., Selyuk M., Gafurov M., Lukin S., Potaskalova V., Sidorik E. Changes in mitochondrial functioning with electromagnetic radiation of ultra high frequency as revealed by electron paramagnetic resonance methods. *International journal of radiation biology* 2014, 90:357-362.
23. Pintado B., de la Fuente J., Roldan E.R. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of reproduction and fertility* 2000, 118:145-152.

24. Lewis S.E., Agbaje I.M. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis* 2008, 23:163-170.
25. Sakkas D., Moffatt O., Manicardi G.C., Mariethoz E., Tarozzi N., Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of reproduction* 2002, 66:1061-1067.
26. Ukeda H., Maeda S., Ishii T., Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Analytical biochemistry* 1997, 251:206-209.
27. Spanier A.M., Traylor R.D. A rapid, direct chemical assay for the quantitative determination of thiobarbituric acid reactive substances in raw, cooked, and cooked/stored muscle foods. *Journal of Muscle Foods* 1991, 2:165-176.
28. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine* 1999, 26:1231-1237.
29. Lewinska A., Wnuk M., Slota E., Bartosz G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2007, 34:781-786.
30. Aitken R.J., Baker M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *International journal of andrology* 2002, 25:191-194.
31. Aitken R.J., Jones K.T., Robertson S.A. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *Journal of andrology* 2012, 33:1096-1106.
32. Nichi M., Goovaerts IG., Cortada C.N., Barnabe V.H., De Clercq J.B., Bols P.E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 2007, 67:334-340.

33. Aitken R.J., De Iuliis G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular human reproduction* 2010, 16:3-13.
34. Sawyer D.E., Mercer B.G., Wiklendt A.M., Aitken R.J. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation research* 2003, 529:21-34.
35. Li Z., Yang J., Huang H. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS letters* 2006, 580:6161-6168.
36. Bennetts L.E., Aitken R.J. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 2005, 71:77-87.
37. Aitken R.J., Bronson R., Smith T.B., De Iuliis G.N. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Molecular human reproduction* 2013, 19:475-485.

5. Esperienze sperimentali *in vivo*

Lavoro 2

REAC technology regenerative treatment tested to healing experimental chondral lesions in ovine animal model

Abstract

Adult cartilage is avascular and has a very slow turnover both at cellular and at molecular level, the defects which not involve subchondral bone are not able to repair. Moreover, in most cases, after a traumatic event that cause a cartilage damage often, the regenerated tissue shows histological characteristics referable to fibrocartilage. This kind of tissue has a lower biomechanical capacity than hyaline cartilage, compromising the joint functionality and conducting, by the time, to degenerative events. In previous works, we highlighted that Regenerative Tissue Optimization (TO-RGN) treatment with radio electric asymmetric conveyer (REAC) technology decreased nitric oxide and metalloproteinase-3 production in normal and OA chondrocytes, while inducing an increase in proteoglycan synthesis. The purpose of our research was to test in ovine animal model, the REAC-TO-RGN treatment, to healing experimental chondral lesions with particular reference to clinical, biomechanical, histological, immunohistochemical and ultrastructural regenerated tissue and its integration with nearby tissues.

Introduction

In the articular cartilage, there are no blood vessels, nerves or lymphatics and the nutrients are supplied by diffusion from the synovial fluid¹. As consequence of the avascular nature, articular cartilage has very slow turnover at the cellular levels and a very limited ability to regenerate. As a result of defects, deriving from trauma or joint disease, the degenerative processes that occurs in the regenerated tissue can stabilizes or progresses in relation to the width and depth of the lesion. The width influence the repair response and just the defects <3 mm in diameter may lead to complete repair with normal hyaline cartilage². Depending on the depth, articular cartilage defect is classified as chondral or osteochondral. In chondral defects, limited within the articular cartilage, the avascular nature of the tissue do not allow the filling or the repairing. Progenitor cells in blood and resident chondrocytes of cartilage cannot migrate to the lesion and do not contribute to the reparative process. In osteochondral cartilage defects, the involvement of chondral layer allow the access to the bone marrow cells and causes a damage into the vasculature. The consequent repair response, that generally begins with an hematoma, results in a fibrocartilage tissue, poorly organized and mechanically inferior compared to the native tissue³. The regeneration of articular cartilage represents an important challenge and numerous approaches are proposed to promote the repair process. Clinical treatment strategies like mosaicplasty, autologous chondrocytes injection and micro fracture have unsatisfactory average long-term results⁴. In recent years, tissue engineering has proposed different systems to develop biological substitutes that restore or improve functionality of damaged tissues. Biomaterial scaffolds play a critical role in providing a 3D environment to support cell growth, matrix deposition, and tissue regeneration. Although biomaterials share excellent physiochemical properties that play a key role in guiding cartilage tissue regeneration *in vitro*, frequently occurs deterioration of articular cartilage regenerated at defect sites *in vivo*⁵. In previous works⁶, we highlighted that Regenerative Tissue Optimization (TO-RGN) treatment with radio

electric asymmetric conveyer (REAC) technology decreased nitric oxide and metalloproteinase-3 production in normal and OA chondrocytes, while inducing an increase in proteoglycan synthesis, key components of cartilage matrix. The purpose of our research was to test in ovine animal model, the REAC TO-RGN treatment, to healing experimental chondral lesions with particular reference to clinical, biomechanical, histological, immunohistochemical and ultrastructural regenerated tissue and its integration with nearby tissues.

Materials and methods

Ethical notes

All the animals have been used in accordance to the Italian and European Laws on animal treatment in Scientific Research (Italian Bioethical Committee, Law Decree on the Treatment of Animals in Research, 27 Jan 1992, No. 116). The operations have been performed in compliance for the welfare and animal testing (CIBASA approval by the University of Sassari and the Ministry of Health, protocol N° 25134 of 10/08/2012).

Experimental design

In this experimental work were used four Sardinian race adult females sheep, average weight 38 kg, clinically free of musculoskeletal diseases. The subjects for REAC treatment underwent a mini arthrotomy of the respective left and right knees articulation, creating an experimental lesion at the level of the medial condyle of each subject. The subjects untreated underwent the same protocol but only in the left knee (Table 1).

Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) technology

Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) Technology for therapeutic use is a recent technology that utilizes radio electric fields asymmetrically conveyed to induce ionic

fluxes and bipolarity optimization in biological structures, for specific bio modulation effects⁶⁻¹⁰. The asymmetric conveyer probe (ACP) is the peculiarity of this technology, constituting the physical link between the device and the patient's body. The ACP applied on specific points or areas of the body makes it possible to create an asymmetric radio electric circuit in combination with the local electrical environment of the cells or tissues and to concentrate the induced radio electromagnetic microcurrents. The ACP provides an electrical tension reference in the point where it is applied and acts therefore as a kind of pole of attraction. The electrical tension reference is fixed and independent of the applied load (the characteristics of the tissues under treatment). Thanks to the radio electric microcurrents asymmetrically conveyed, REAC technology is able to normalize the existing currents flows, when these were reduced in quantity and altered in transmission. The model used in this study (B.E.N.E, ASMED, Florence, Italy).

The REAC treatment utilized in this study is named tissue optimization (TO) regenerative treatment (RGN). TO-RGN includes a set of treatment protocols, which are carried out by the ACP applied on specific points or areas of the body.

Surgery

The anesthesia protocol expected, for all animals consists in a premedication with administration of Fentanyl intravenous injection 5 mg / kg (Fentanest® 0,1 mg/2ml - Pfizer) and Diazepam intravenous injection 0,3 mg/Kg (Valium® 10 mg/2ml - Roche). With the animal in sternal recumbency it was then performed with 22G Quincke spinal needle epidural anesthesia at sacred-coccygeal, by injection of lidocaine 2 mg / kg (Lidocaina® 2%, 20 mg/ml - Pfizer). 15 minutes after premedication was performed the induction of general anesthesia with lidocaine intravenous 1 mg / Kg (Lidocaina® 2%, 20 mg / ml, Pfizer) and intravenous Thiopental 5 - 7 mg / Kg (Pentothal Sodium® 1 g / 50 ml - MSD Animal Health) to allow intubation of the subject. General anesthesia

was maintained with Sevoflurane (Sevo Flo[®] - ABBOTT) with values close to 1.5%, in O₂0.8 l / min, with mechanical ventilation in volumetric control (Fabius GS - Dräger) with frequency breathing 12 breaths / minute and tidal volume for keeping EtCO₂ to 37 to 42 mmHg (Infinity Delta - Dräger). For the entire duration of the surgery it was performed an infusion of 0.9% NaCl at a dose of 10 ml /kg/ h. The animals were placed in dorsal recumbency and subjected to arthrotomy of the knee joint to expose the articular surface of the femoral condyles. After thorough disinfection and preparation of the operative field, the limb was positioned with the knee in full flexion to improve the slip to the bottom of the kneecap. With a scalpel blade No. 11, in correspondence of the medial side of the tibio-patellar ligament and in correspondence of the convexity of the medial femoral condyle, easily palpable via trans-dermal, it was performed a full-thickness incision of the length of 5mm. Performed the incision was placed a first Gelpi self-retaining retractor in distal-proximal direction while a second retractor was positioned perpendicular to the first. Exploiting the elasticity of the tissues and the action of Gelpiretractors, it was possible to expose a surface of the femoral condyle of about one cm²(fig. 1 a). It was then created an osteochondral defect on the loading area of the medial femoral condyle of the left knee; injury, had a size such as to counter effectively the spontaneous healing: the so-called "critical size" suggested by the literature, for sheep is equal to 6 mm in diameter with a depth equal to about 2 mm, of cylindrical shape, with sharp margins, localized on the area of the femoral condyle. To standardize the lesion has been used a punch for osteochondral transplantation diameter of 6 mm which, resting on the joint surface and gently rotated clockwise and counterclockwise, has delimited the limits of the defect (fig. 1 b). The cartilage tissue within the area has been removed by milling with cylindrical tip and finished with a curette for bone to a depth of about 2 mm (fig. 1 c, d, e). It was strictly adhered continuous irrigation with 0.9% NACL to avoid the heating of the cartilage in the area where the milling cutter was used, and the drying of the entire articular surface exposed to air.

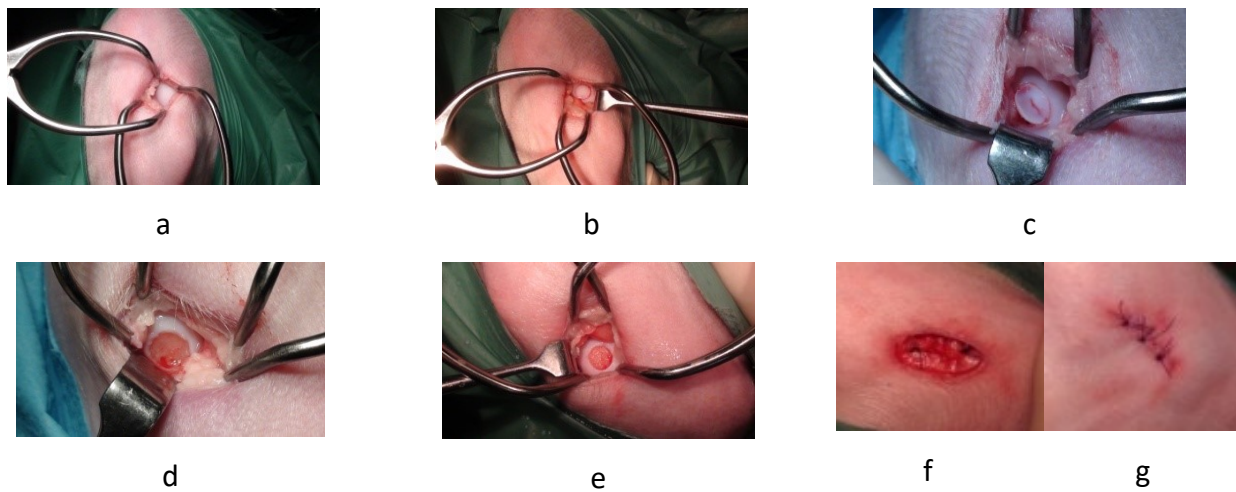


Fig. 1 – a, b,c, d, e, f, g
Surgical phases

The reconstruction was performed “*lege artis*” with the suture in separate planes of the joint capsule and the skin with synthetic absorbable monofilament (Monocryl U.S.P 4/0) (fig. 1 f, g).

Post-operative treatment

All subjects were housed in small enclosures and treated with REAC TO-RGN protocol, for 7 consecutive days. The ACP probe applied in both legs in the hip femoral-tibial-patellar, was replaced every 12 hours. After treatment, the animals were confined in small spaces, to limit movement, and then returned to pasture until euthanasia. After surgery, all subjects were clinically evaluated daily during the first week of REAC TO-RGN treatment (fig. 2 a, b, c); following the removal of cutaneous points the clinical evaluation of the animals took place once a week until euthanasia performed at 6 months. All samples of all groups were subjected to macroscopic, histological, immunohistochemical evaluations and ultrastructural regenerated tissues and its

integration with the surrounding tissue. It was also carried out an ultrastructural evaluation of the regenerated tissue and its integration with the surrounding tissue.



a



b



c

Fig. 2 a, b, c
REAC TO-RGN treatment

Macroscopic assessment

Sheep were euthanized at six months after treatment and both femoral condyles were exposed, transverse sectioned, perpendicular to the articular surface and about 1-2 cm deep to evaluate the quality of the newly formed tissue, and photographed. The regenerating tissue in the cartilage defects was examined by two observers applying a semi-quantitative scoring system, developed by the International Cartilage Repair Society (ICRS) and modified by the authors (see additional file 1, table 1), and the values were averaged. Observations were initially recorded as percentages (surface appearance, filling of the defect, and graft-host integration at the margins). These percentages were converted to scores for purposes of statistical analysis.

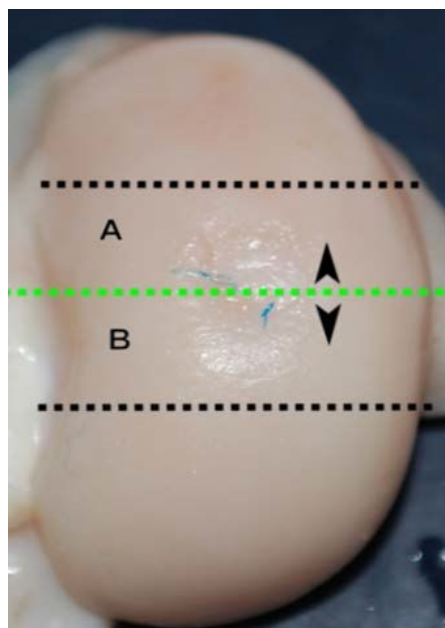


Fig 3

Preparation of the condyles. Trimming of lesion; line section of lesion A and B) half lesion

Histological and immunohistochemistry procedures

Condylar articular defects were removed as osteochondral blocks (thickness: 0.5 cm; width: 2-3 cm; height: 1-2 cm; distance of cutting from edges of defect: 0.5 cm) by using a circular saw supplied by a water circuit to avoid the blade overheating. It was very important to evaluate the defect in all point, therefore each defect was sectioned in two part (A and B) and each part was scored (Fig.3). The blocks were fixed in 10% neutral-buffered formalin for 2-4 days and, then, transferred in a volume about 20 times bigger than samples of a decalcification solution (1:1 acid citric / formic acid solution) placed on a magnetic stirrer, for 2-4 days. After washing in running tap water for 4-8 h to remove all decalcification solution traces, samples were dehydrated as follow: alcohol 50° for an indefinite time (standby step); alcohol 80° for 4 h at 40°C; alcohol 90° for 4 h at 40°C; alcohol 100° for 4 h at 40°C; 3 steps in xylene of 1 h each at 40°C; 3 steps for paraffin infiltration of 45 min each at 59°C. After embedding in paraffin wax, blocks were mounted on a microtome and orientated to provide 3 µm sagittal sections of the surgical defect. Slices were mounted on **3-aminopropyl-triethoxylanepretreated** slides to avoid their detachment. To evaluate the general tissue morphology, sections were stained with Haematoxylin-Eosin; among special 62taining to evaluate matrix cartilage composition, Azan-Mallory staining was chosen to assess the presence, amount and distribution of the collagen fibers and Safranin-O to reveal the presence and distribution of proteoglycans. All slides were processed together in the same day to prevent variables due to the histological process. To analyze the expression of the collagen type II in the cartilage matrix, the histological sections were deparaffinized, rehydrated and incubated at 37°C with proteinase K to unmask the antigen binding sites. The endogenous peroxidases were blocked with a 30 min incubation in Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution (S2023, Dako, Glostrup, Denmark), and the saturation of non-specific binding sites were performed using 2.5% normal horse serum (ImmPRESS reagent kit, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min at room temperature. Then, sections were

incubated overnight at 4°C with a type II Collagen rabbit polyclonal antibody (anti-Collagen type II LS-C18868 LSBio) at 1:20.000 dilution. After about 16h at 4°C, the section were incubated for 30 min at room temperature with anti-mouse/rabbit secondary antibody peroxidase conjugated (MP-7500, ImmPRESS reagent kit Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). After staining with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (ImmPACT DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) tissues were counterstained with hematoxylin, cover-slipped with Eukitt Mounting MediumTM (BiOptica, Milan, Italy) and observed under light microscopy. The femoral condyle of untreated sheep served as positive control. Negative controls were carried out by omission of the primary antibody. Lesions were recorded using a Nikon Ds-fi1 digital camera.

Evaluation of histological and immunohistochemical data – The histological regeneration was evaluated by two independently observers using a cartilage repair grading system derived from Caplan et al ¹¹, Pilichi et al² and modified by the authors (see additional file 1, table 2). The two values obtained for each sample were averaged.

Results

Treated group – Evaluation 6 months after REAC TO-RGN treatment

The macroscopic analysis after 6 months showed a similarity in the regeneration process of the two right and left condyles. The lesion appeared filled, though not completely of new generated tissue of light opalescent color similar to healthy cartilage, which covered completely the underlying subchondral bone (Fig. 4 A, F, K and P). The newly formed tissue surface appears quite regular. The continuity with the healthy tissue appears good, index of a good integration of the margins of the lesion. Have not been seen breakages or cracks in the newly formed tissue. The macroscopical macro show respectively for the two subjects a 20,75/24 and 16,25/24

with a mean of 18,5/24 score point (table 1). The macroscopic observations were confirmed by histological examination, in fact, the subject treated after six months has reached the overall score, respectively for the two subjects, of 37,75/62 and 48/62 with a mean of 42,87/62 score point (table 2).

Was histologically observable, the formation of immature hyaline cartilage that covered the lesion in a uniform manner but with slight irregularities and deformations of the surface; furthermore the filling was not complete as it was already macroscopically observed. Actually in the cartilage we did not observe significant differences between the observations made in the two subjects treated, as it emerges from the score. The structure of the newly formed cartilage has assumed characters of immature hyaline cartilage type, with numerous isogenic proliferation groups both in the margins and in the center of the lesion, and many chondroblasts and chondrocytes active. The integration with the bone looks good, it is also observable a beginning of ossification of deep cartilage, and a sketch of tidemark albeit intermittently. The subchondral bone shows signs of remodeling and ossification. There were no cavities or subchondral cysts. The specific colorations for proteoglycan matrix deposition appears good so also the coloration of Collagen II has given a strong marking quite similar to the healthy cartilage in both of left and right condyle. The most interesting observations were seen in bone and morphology repair subsection. Here in fact we observed a nearly complete regeneration of subchondral bone in its final structure, with little vascularization and ossification nuclei almost absent (Fig. 4). This finding is confirmed by the score regarding the bone where we got a gap of 29% with the subject treated with untreated (6,88/9 vs. 4,25/9 points, mean of all samples). Furthermore, the morphology subsection finding showed a gap of 35,22% with the subject treated with untreated (7,88/9 vs. 4/9 points, mean of all samples). In all observed samples, the tidemark appeared irregular and incomplete and the marking of the matrix was good, as we had already observed in the samples

untreated. The mean of total score macro and micro of REAC-TO RGN treated subject was 61,37/86 with a 71,37% of repair process (table 1, 2 and 3).

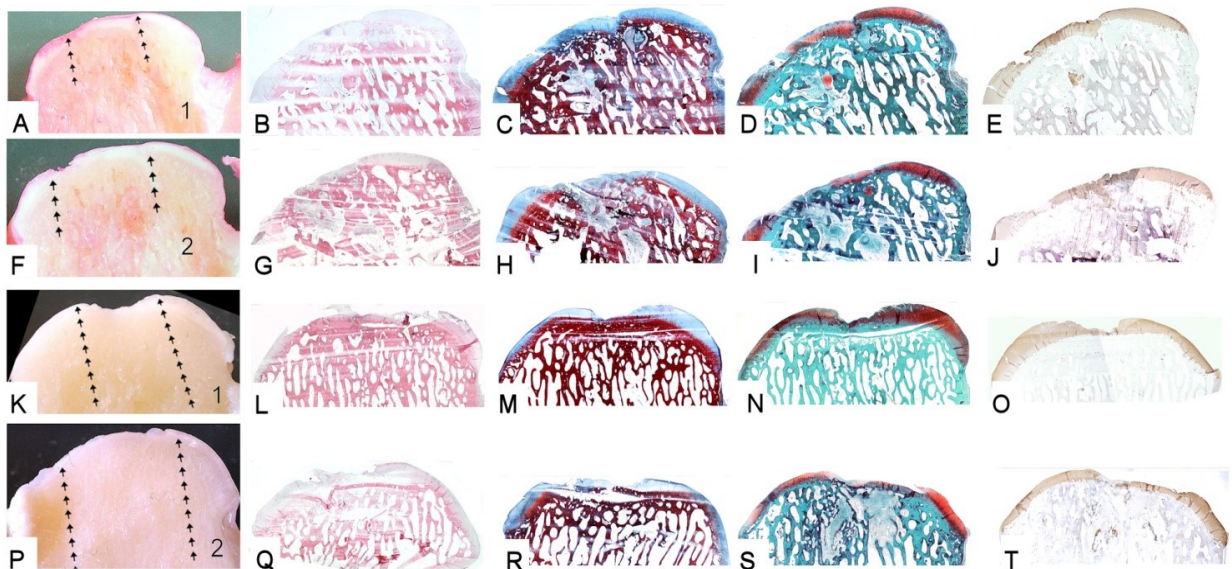


Fig. 4

Treated group: macro and histological observations

Untreated group evaluation after six months

The untreated subject condyles after 6 months show a considerably delayed reparative process compared to the subject treated with REAC TO-RGN. Macroscopically the lesion was filled incompletely and with an irregular surface of the lesion. We observed a very different appearance in all untreated condyles, they presented a poor repair with large depressed area covered by fibrous tissue. In particular, the left condyle has a deep cavity that penetrates to the subchondral bone (Fig. 5 A, F, K and P). Histologically, the presence of the cavities are confirmed. In the left condyle is observed a fibrous tissue cover, with few chondrogenic elements. In one condyle appear obvious cysts (Fig. 5 H and M). The staining of the matrix of the

condyles showed a little staining and an evident marking of collagen II absent in large parts, demonstrating a lack of cartilage formation. Moreover, even the matrix deposition is not uniform and appear cartilage tissue islands immersed in fibrous tissue, appearance detectable with not uniform marking of collagen II (Fig. 5 E, J, O and T). The bone remodeling is still sizeable, a sign that the process of ossification has not yet happened. Were not observed development signs of the tidemark in both condyles. The mean of total score macro and micro of untreated subject was 41/86 with a 47,67% of repair process (table 1, 2 and 3).

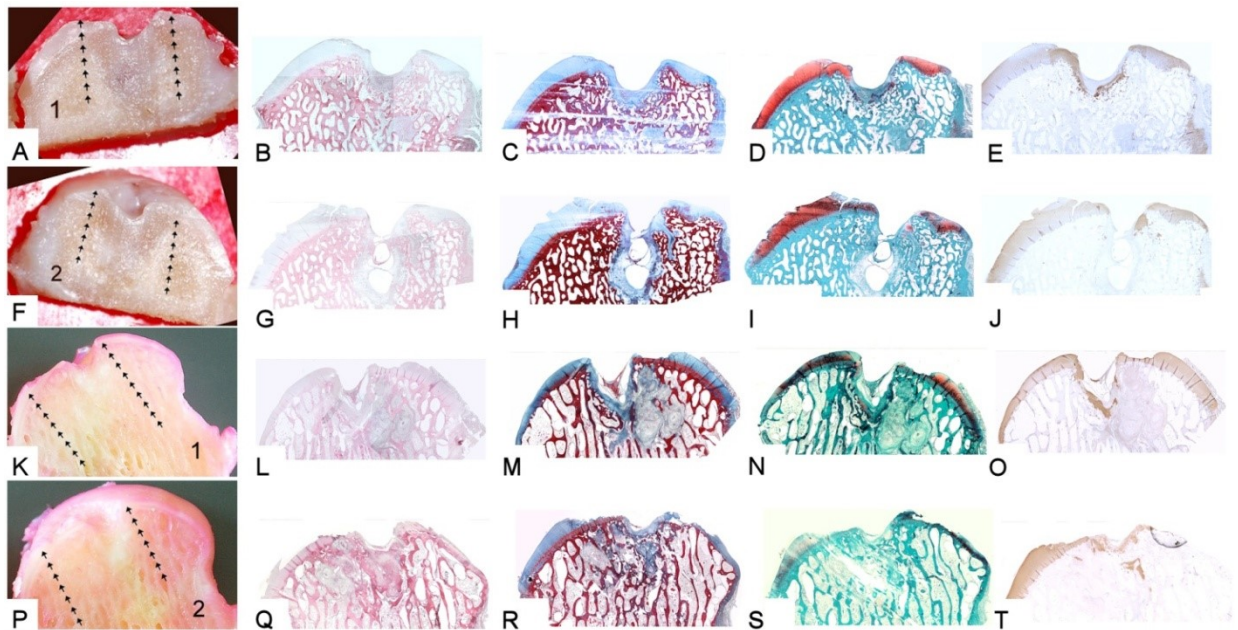


Fig. 5

Untreated group: macro and histological observations

Discussion

This translational study stems from the need to test *in vivo*, the REAC - TO RGN treatment protocol used *in vitro*, in an our previous work on human normal and osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1 β ⁶. Of course, the experimental conditions were totally different, but the purpose of this work was to develop REAC TO-RGN timing and administration protocol to treat injuries or determine regenerative processes of cartilage in human medicine. For this reason, we have produced in a sheep model an osteochondral defect on the loading area of the medial femoral condyle of left knee, so that injury had a size such as to counter effectively the spontaneous healing. Moreover, we decided to treat injury with noninvasive REAC TO-RGN treatment protocol by ACP probe applied in both legs in the hip femoral-tibial-patellar area for seven consecutive days and carry out the control at 6 months, the minimum time earmarked for evaluating an initial lesion repair. The results obtained in this preliminary study seem encouraging, both in terms of quantity and quality, in fact, the analysis of the scores obtained between the groups treated and untreated show a positive score in favor of the REAC TO-RGN treated group. The number of lesions does not allow for a statistical evaluations. Although future investigations are needed the present work clearly discloses the possibility that REAC TO-RGN may be a valuable therapeutic tool in the treatment of cartilage damages.

Table 1. Experimental design.

Period-groups	N° of sheep	Stifle joint (femoral condyle)	Treatment
6 months	2	left	REAC
		right	REAC
6 months	2	left	None
total	4	6	

Table 2. Macroscopical score

Sheep	Condile	Half lesion	Surface			Section aspect					Total	Mean half lesions	Mean subject
			% Fd	S1	S2	Gr ti	Sc t1	Sc t2	Sc t3	Sct4			
6 month stratt	CMS	A	2	3	4	2	3	2	3	3	22	21	20,75
		B	2	3	4	2	2	1	3	3	20		
	CMD	A	2	3	3	3	2	2	3	3	21	20,5	
		B	2	3	3	3	1	2	3	3	20		
6 month stratt	CMS	A	2	2	3	1	1	1	3	3	16	16	16,25
		B	2	2	3	1	1	1	3	3	16		
	CMD	A	2	2	2	1	1	1	3	3	15	16,5	
		B	2	2	2	2	2	2	3	3	18		
6 months untratt	CMS	A	0	1	0	0	0	1	3	3	8	8	
		B	0	1	0	0	0	1	3	3	8		
6 months untratt	CMS	A	1	1	1	1	3	2	3	1	13	13	
		B	1	1	1	1	3	2	3	1	13		

Table 3. Microscopical score

Sheep	Cond	Half lesion	Cart. ¹	Bone ²	Morph ³	Vasc. ⁴	Deg ⁵	Infl.	Matr ⁶	Tot	Mean half lesions	Mean subject
6 months tratt	CMS	A	2	4	6	0	8	3	5	28	32	37,75
		B	7	6	8	0	9	3	3	36		
	CMD	A	7	6	9	1	10	3	4	40	43,5	
		B	7	6	8	4	12	3	7	47		
6 months tratt	CMS	A	6	9	8	4	10	3	7	47	45,5	48
		B	6	7	8	3	10	3	7	44		
	CMD	A	7	9	9	7	11	3	7	53	50,5	
		B	7	8	7	7	9	3	7	48		
6 months untratt	CMS	A	5	4	6	0	12	3	4	34	28,5	
		B	2	1	5	0	8	3	4	23		
6 months untratt	CMS	A	6	6	2	3	11	0	4	32	32,5	
		B	6	6	3	3	11	0	4	33		

¹ C1+C2+C3, ² B1+B2, ³ Fd+Edg+Int+Tdk, ⁴ V1+V2, ⁵ D1+D2+D3+D4, ⁶ M1+M2+M3

References

- 1 Fox A.J.S., Bedi A., Rodeo S.A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*1, he basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461-468, doi:10.1177/1941738109350438 (2009).
- 2 Pilichi S., Rocca S., Pool R.R., Dattena M., Masala G., Mara L., Sanna D., Casu S., Manunta M.L., Manunta A., Sanna Passino E. Treatment with embryonic stem-like cells into osteochondral defects in sheep femoral condyles. *BMC Vet Res* 10, 301, doi:10.1186/s12917-014-0301-9 (2014).
- 3 Steinert A.F., Ghivizzani S.C., Rethwilm A., Tuan R.S., Evans C.H., Nöth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 9, 213, doi:10.1186/ar2195 (2007).
- 4 Kock L., Van Donkelaar C.C., Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res* 347, 613-627, doi:10.1007/s00441-011-1243-1 (2012).
- 5 Zhang L., Hu J., Athanasiou K.A.. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng* 37, 1-57 (2009).
- 6 Collodel G., Fioravanti A., Pascarelli N.A., Lamboglia A., Fontani V., Maioli M., Santaniello S., Pigliaru G., Castagna A., Moretti E., Lacoconi F., Rinaldi S., Ventura C. Effects of regenerative radioelectric asymmetric conveyor treatment on human normal and osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1beta. A biochemical and morphological study. *Clin Interv Aging* 8, 309-316, doi:10.2147/CIA.S42229 (2013).
- 7 Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Fontani V., Ventura C. Radiofrequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool for improving tissue regeneration. *Cell transplant* 2, 1225-1233, doi: 10.3727/096368911X600966 (2012).

- 8 Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Cavallini C., Fontani V., Ventura C. Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages. *Cell Transplant* 22, 1227-1235, doi:10.3727/096368912X657297 (2013).
- 9 Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Delitala A., Bianchi F., Tremolada C., Fontani V., Ventura C. Radioelectric asymmetric conveyed fields and human adipose-derived stem cells obtained with a nonenzymatic method and device: a novel approach to multipotency. *Cell Transplant* 23, 1489-1500, doi:10.3727/096368913X672037 (2014).
- 10 Rinaldi S., Maioli M., Pigliaru G., Castagna A., Santaniello S., Basoli V., Fontani V., Ventura C. Stem cell senescence. Effects of REAC technology on telomerase-independent and telomerase-dependent pathways. *Sci Rep* 4, 6373, doi:10.1038/srep06373 (2014).
- 11 Caplan A.I., Elyaderani M., Mochizuki Y., Wakitani S., Goldberg V. M. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 254-269 (1997).

6. Esperienze cliniche

Questo capitolo raccoglie le esperienze più significative nell'utilizzo della Tecnologia REAC nella pratica clinica nel corso del triennio. La tabella n. 4 riassume tutti i casi trattati.

Tabella n°4a - Casi clinici (cani) trattati con la tecnologia REAC

Nome	Razza	Età	Sesso(I/S)	Peso (Kg)	Patologia
Memole	Meticcio	13 anni	F(S)	14	Rottura LCCDX
Memole	Meticcio	13 anni	F(S)	14	Rottura LCCSX
Maya	Siberian Husky	3 anni	F(S)	40	Rottura LCCSX
Maya	Siberian Husky	3 anni	F(S)	40	Rottura LCCDX
Luna	Setter	10 anni	F(I)	25	Rottura LCCSX
Asia	Meticcio	6 anni	F(S)	26	Rottura LCCDX
Asia	Meticcio	6 anni	F(S)	26	Rottura LCCSX
Nikita	Barboncino	9 anni	F(S)	17	Rottura LCCSX
Nikita	Barboncino	9 anni	F(S)	17	Rottura LCCDX
Lilly	Pastore Maremmano	4 anni	F(I)	45	Rottura LCCSX
Lilly	Pastore Maremmano	4 anni	F(I)	45	Rottura LCCDX
Isabel	Labrador Retriever	5 anni	F(I)	40	Rottura LCCDX
Isabel	Labrador Retriever	5 anni	F(I)	40	Rottura LCCSX
Minou	Meticcio	5 anni	F(S)	12	Rottura LCCSX
Bricconcello	Beagle	6 anni	M(I)	22	Rottura LCCDX
Pongo	Meticcio	8 anni	M(I)	17	Rottura LCCSX
Minnie	Meticcio	5 anni	F(S)	15	Rottura LCCDX
Lupin	Cane Corso	2 anni	M(I)	38	Rottura LCCDX
Tosca	Meticcio	7 anni	F(S)	40	Rottura LCCDX
Tosca	Meticcio	7 anni	F(S)	40	Rottura LCCSX
Pulce	Meticcio	12 anni	F(S)	17	Rottura LCCSX
Fiore	Meticcio	10 anni	F(S)	26	Rottura LCCDX
Gaia	Terranova	3 anni	F(I)	45	Rottura LCCDX

Buffo	Meticcio	2anni	M(I)	12	frattura radio-ulna esposta,riassorbimento osseo,mancata unione.
Pimpa	Meticcio	8 mesi	F(S)	10	frattura radio-ulna complicata da osteomielite, mancata unione
Polly	Cocker	3 mesi	F(I)	2,5	sindrome atassica, lesione pregressa L7
Hollie	Cocker	9 mesi	F(I)	15	displasia dell'anca
Crack	Polly	1 mese	F(I)	1,5	frattura bilaterale delle branche della mandibola
Ginger	Hollie	3anni	F(I)	25	artrodesi gomito e carpo dx
Luna	Pastore tedesco	1 anno	F(I)	35	frattura tibia dx
Juna	Pastore tedesco	12 anni	F(I)	25	Spondilartrositoracolumbare e artrosi del ginocchio dx
Febo	Pastore tedesco	2 anni	M(I)	25	miosite anconeo sx
Argo	Meticcio	5 anni	M(I)	18	frattura radio-ulna sx
Luna	Pastore tedesco	6 mesi	F(I)	13	frattura tibia dx
Agata	Dalmata	13 anni	F(S)	20	ernia cervicale
Fox	Bassotto	9 anni	M(I)	6	paresi treno posteriore ernie discali, spondilartrosi
Kiku	Dalmata	10 anni	F(S)	25	sindrome della cauda equina,ernia cervicale, tetraparesi spastica
Camilla	Dalmata	10 anni	F(S)	22	ernia cervicale
Bianca	Chihuahua	2 anni	F(I)	2	idrocefalo, siringomielia
TNT	Pastore Belga	4 mesi	M(I)	15	ansia
Lex	Cane Corso	3 anni	M(I)	50	ansia che sfocia in aggressività
Febe	Cane Lupo Cecoslovacco	6 anni	F(I)	35	ansia
Leonardo	Labrador Retriver	3 anni	M(I)	35	ansia e aggressività
Milo	Pechinese	6 anni	M(I)	7	aggressività
Apollo	Meticcio	6 anni	M(I)	6	dermatite allergica

Peppino	Golden Retrive	5 anni	M(I)	30	patologia della cicatrizzazione (da melanoma)
Krami	Doberman	4 anni	F(I)	27	dermatite stafilococcica
Greta	Pastore tedesco	3anni	F(S)	25	ascesso da corpo estraneo

Tabella n°4b - Casi clinici (cavalli) trattati con la tecnologia REAC

Nome	Razza	Età	Sesso (I/S)	Peso (kg)	Patologia
Adriana	Sarcidano	1 mese	F	70 kg	Contrattura bilaterale dei tendini flessori anteriori.
Arrogutottu	AAS	1 mesi	M	80kg	Lassità dei tendini flessori (bipede anteriore), piaghe al nodello
Terrios	Sella italiano	3 anni	M	550kg	Desmitellegamento sospenditore del nodello anteriore sx
Arcadu	AA	5 anni	M(C)	450kg	Ascesso piede anteriore dx
Bric	AA	7 anni	F	430 kg	Ascesso occhio dx
Sissi	AA	20 anni	F	420 kg	Linfedema arto posteriore dx
Agris	Sella italiano	10 anni	F	540 Kg	Frattura gomitosx
Fulmine	Sella italiano	8 anni	M(C)	570 kg	Spavonio posteriore sx
Monterra	AA	3 anni	F	480 Kg	Bursite (cappelletto) garretto dx
Parigi	Sella italiano	4 anni	M	590 Kg	Formella pastorale anteriore sx
Dingo	AA	8 anni	M(C)	480 KG	Ragadi pastorale anteriore
Jolie	AA	5 anni	M(C)	530 Kg	Tenosinovite (molletta) grande sesamoidea anteriore sx
Grigio	AA	3 anni	F	460 Kg	Paralisi del facciale
Olinda	Sella italiano	3mesi	M	120 kg	OCD grassella sx
Giselle	Sella italiano	1 settimana	F	60kg	Deviazione angolare (del carpo) bipede anteriore
Tests	Sella italiano	2anni	M(I)	500kg	Tumefazione testicolo (soluzione di continuo da c.e.penetrante)
Picciau	AAS	3anni	M(C)	550kg	Frattura metacarpo dx
Diavolo	Sella italiano	2 anni	F	430Kg	Cisti ossea metacarpo sx
Gyango	AA	12 anni	M (C)	400 Kg	Mal del garrese (fistola)

Particolare attenzione è stata rivolta alle lesioni dell'apparato muscolo-scheletrico del cane e del cavallo ed alle lesioni del legamento crociato craniale del cane.

Lavoro 3

Valutazione della REAC terapia in cani con rottura del Legamento Crociato Craniale (CCL). Valutazioni preliminari.

La lesione del legamento crociato anteriore (CCL), da solo o insieme ad altre strutture articolari, dipende dal particolare ruolo svolto che costituisce la struttura principale nel garantire la stabilità articolare del ginocchio. Il CCL infatti previene lo scivolamento craniale della tibia rispetto al femore, limita la rotazione interna della tibia sul femore e previene l'iperestensione del ginocchio. Qualsiasi causa che comporti una forza eccessiva in ognuna di queste direzioni, determina una lesione a carico del legamento. Difetti di conformazione nonché flogosi di varia natura dei tessuti articolari, possono favorire fenomeni degenerativi del legamento e portare anch'essi ad indebolimento sino a lacerazione dello stesso. L'instabilità articolare provocata dalla sua rottura è a sua volta causa di abnormi sollecitazioni sulle altre strutture articolari, con conseguente dolore e zoppia. Con il tempo si instaurano ipotrofia muscolare dell'arto interessato ed artrosi a carico del ginocchio.

La prima documentazione di ricostruzione di CCL risale al 1917, quando Hey Groves la eseguì sull'uomo. In Medicina Veterinaria le prime esperienze sono ad opera di Paatsama, che già nel 1952 descrisse l'importanza del segno del cassetto anteriore, la possibilità di una rottura parziale del legamento oltre alla già nota rottura completa e, più tardi, le prime metodiche di ricostruzione applicate nel cane. Paatsama ha dichiarato che nelle lesioni di vecchia data, il grado di zoppia era estremamente variabile, e annoverava come possibili cause di instabilità e di dolore l'atrofia del quadricipite e la lesione del menisco. Riteneva che la terapia conservativa fosse di scarso valore e che l'intervento per la stabilizzazione dovesse essere effettuato nel più breve tempo possibile dall'infortunio. Negli anni successivi, sono seguite numerose descrizioni sulle tecniche operative per la stabilizzazione nel cane con rottura del CCL (*Knecht, 1976*) sino alle recenti TPLO e TTA che hanno ottenuto buoni risultati sia in

termini di parziale controllo dell'instabilità articolare che di recupero funzionale dell'arto.

Nel tempo, i diversi Autori hanno concordato sull'eziopatogenesi della patologia, complessa e multifattoriale, quale risultato finale di eventi traumatici, degenerativi, conformazionali, anatomici e autoimmunitari (Johnson e Johnson, 1993; Lawrence et al, 1998; Lemburg et al, 2004; Comerford et al, 2004; de Rooster et al, 2006; Muir et al, 2007; de Bruin et al, 2007).

Il vero problema da limitare è quello relativo all'artrosi secondaria all'instabilità articolare che si crea dopo la rottura del CCL e sulle terapie in grado di garantire l'arresto o il rallentamento della formazione di processi degenerativi ed un recupero più veloce del paziente.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i risultati clinici della REAC in cani sottoposti a terapia per la rottura del Legamento Crociato Craniale (CCL).

Casistica clinica

16 cani sono stati visitati presso l'Ospedale Didattico Veterinario Universitario (ODVU) del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari nell'arco di tempo intercorrente tra dicembre 2012 e dicembre 2016.

Lo studio è stato condotto suddividendo i soggetti, classificati per età, sesso e razza, in due gruppi relativamente al peso corporeo: gruppo A (< 15Kg) e gruppo B (> 15 Kg).

A tutti i soggetti, a seguito di esame clinico ed esame radiologico è stata diagnosticata la rottura del legamento crociato craniale.

Sette dei soggetti hanno presentato rottura del CCL bilateralmente, tutti gli altri monolaterale (4 a sinistra e 5 a destra).

La visita clinica e l'esame ortopedico hanno consentito di assegnare ad ogni animale un grado di zoppia variabile da 0 a IV: IV grado a 1 casi, III grado a 15 cani.

Grado di Zoppia	
0	Nessuna zoppia, nessuna alterazione nel movimento dell'arto.
I	Zoppia lieve, movimento leggermente alterato, carico dell'arto.
II	Blanda zoppia, movimento alterato ma con funzionalità mantenuta, carico dell'arto anche se limitato.
III	Zoppia moderata, movimento alterato e funzionalità alterata, talvolta l'arto non viene appoggiato.
IV	Zoppia grave, movimento alterato e perdita della funzionalità, stazione tripodale.

Tabella n° 1 - Suddivisione delle zoppie secondo il grado di gravità.
In: Leo Brunberg - La diagnosi di zoppicatura nel cane. Ed. Giraldi (2006), pag. 28

Tutti i soggetti risultavano positivi al test del cassetto ed a quello della compressione tibiale.

Tutti i proprietari hanno rifiutato per i loro animali l'intervento chirurgico ed hanno optato per un management non chirurgico. La patologia era ormai cronica in quanto presente da oltre tre settimane.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti alla REAC. La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO), finalizzata all'avvio dei corretti meccanismi neuro psico biologici di feedback alle condizioni ambientali ed al miglioramento delle strategie motorie e posturali. Il trattamento, assolutamente indolore e non invasivo, è consistito in un'unica seduta della durata di 500ms che è stata eseguita poggiando il probe dell'apparecchiatura su uno specifico punto interno alla base dell'orecchio localizzato alla base dell'*Antitragus* dell'orecchio sinistro (fig. 6).

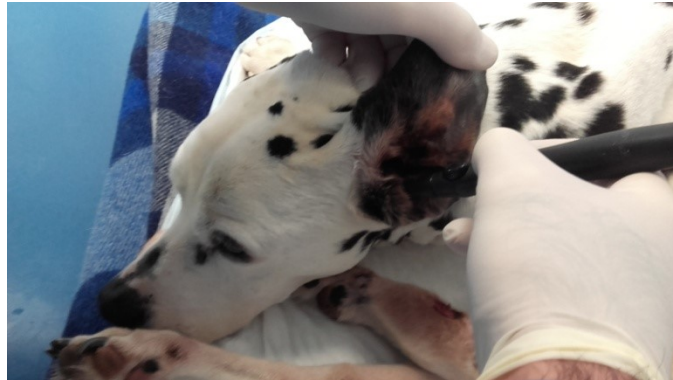


Fig. 6
VNPO

In seguito, come secondo protocollo, abbiamo impiegato la VNPPPO che ha previsto l'applicazione di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale con l'obiettivo di promuovere una ottimizzazione dei meccanismi di controllo del sistema nervoso su distretti corporei modificati da eventi traumatici o patologie localizzate (fig. 7).



Fig. 7
VNPPPO

Il protocollo ha previsto 18 applicazioni suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra). Anche questo trattamento è assolutamente indolore e non invasivo.

L'apparecchiatura REAC utilizzata in questo studio è il mod. CRM, prodotto da ASMED Srl Firenze, Italia (fig. 8).



Fig. 8
mod. CRM, prodotto da ASMED Srl Firenze, Italia

La gestione conservativa dalle 3 alle 8 settimane prevedeva movimento controllato attraverso passeggiate al guinzaglio e, quando indicato, il ripristino delle condizioni ideali del peso.

È stato considerato un risultato "ottimale" la completa risoluzione della zoppia con minima o nessuna atrofia muscolare e/o un normale *range of motion* con assenza di dolore ai movimenti passivi. I cani con zoppia occasionale, con atrofia muscolare minima o assente, e i cani con un *range of motion* normale o minimamente ridotto

sono stati classificati come "migliorati". I casi di zoppia invariata o di peggioramento per un minimo di 6 mesi sono stati considerati come "fallimento" della terapia.

Tutti i dati sono stati registrati e riportati nella tabella n° 2.

Tabella n. 2 – Casi clinici Legamento Crociato Craniale

Nome	Razza	Età	Sesso(I/S)	Peso Kg	Diagnosi Rottura LCC	Zoppia prima terapia	Zoppia dopo terapia
Memole	Meticcio	13 anni	F(S)	14	DX	III	0
Memole	Meticcio	13 anni	F(S)	14	SX	III	0
Maya	Siberian Husky	3 anni	F(S)	40	SX operata	III	I
Maya	Siberian Husky	3 anni	F(S)	40	DX	III	I
Luna	Setter	10 anni	F(I)	25	SX	III	0 (II solo dopo sforzo prolungato)
Asia	Meticcio	6 anni	F(S)	26	DX operata	III	I (solo dopo sforzo prolungato)
Asia	Meticcio	6 anni	F(S)	26	Sx	III	I (solo dopo sforzo prolungato)
Nikita	Barboncino	9 anni	F(S)	10	SX	III	0
Nikita	Barboncino	9 anni	F(S)	10	DX	III	0
Lilly	Pastore Maremmano	4 anni	F(I)	45	SX	III	III
Lilly	Pastore Maremmano	4 anni	F(I)	45	DX operata	III	II
Isabel	Labrador Retriever	5anni	F(I)	40	DX	III	0
Isabel	Labrador Retriever	5anni	F(I)	40	SX	III	0
Minou	Meticcio	5 anni	F(S)	12	SX	III	0
Bricconcello	Beagle	6 anni	M(I)	15	DX	III	0
Pongo	Meticcio	8 anni	M(I)	14	SX	III	0
Minnie	Meticcio	5 anni	F(S)	12	DX	IV	0
Lupin	Cane Corso	2 anni	M(I)	38	DX	III	I
Tosca	Meticcio	7 anni	F(S)	40	DX	III	0
Tosca	Meticcio	7 anni	F(S)	40	SX	III	0
Pulce	Meticcio	12 anni	F(S)	15	SX	III	0
Fiore	Meticcio	10 anni	F(S)	26	DX	III	I
Gaia	Terranova	3 anni	F(I)	45	DX	III	0

Risultati

Gruppo A.

I dati relativi ai cani con un peso corporeo inferiore o uguale a 15 kg (7 casi) sono riportati nella tabella n° 2, colorati in blu.

Il genere femminile è stato più numeroso rispetto al maschile. Questi cani avevano un'età media superiore (6.4 anni) rispetto ai cani di grossa taglia che presentavano un'età media di 5.5 anni. I cani, alla prima visita, hanno presentato un'evidente ipotrofia muscolare. La palpazione delle articolazioni colpite, eseguita con l'animale sveglio, ha rivelato un segno del cassetto positivo in tutti i 7 pazienti. A tutti i cani è stato assegnato un grado di zoppia minimo di 3. Relativamente alla valutazione radiografica, non hanno mostrato segni evidenti di malattia degenerativa dell'articolazione in esame.

I 7 cani sono stati visitati a distanza di 15 giorni dalla fine del trattamento con la piattaforma REAC, e dopo due mesi dalla fine dello stesso evidenziando un progressivo e graduale miglioramento rispetto all'esame clinico iniziale. I proprietari hanno valutato mediamente la scomparsa della zoppia in un intervallo temporale di durata media di 30 giorni (*range* 1 settimana – 40 giorni). 7 su 7 cani (100%) sono stati classificati come "normali" o "migliorati".

Dei 7 pazienti classificati come "migliorati" nessuno ha mostrato zoppia all'esame finale; 3 su 7 proprietari hanno dichiarato che i loro cani hanno presentato saltuariamente lieve zoppia dopo un esercizio fisico vigoroso, senza notare una correlazione con il cambiamento del clima freddo/umido. I pazienti non hanno presentato ipotrofia muscolare e al controllo radiografico non sono apparse variazioni significative rispetto ai controlli precedenti.

Gruppo B.

I dati relativi ai cani con un peso corporeo superiore a 15 kg (9) sono riassunti nella tabella n° 2. L'età dei cani al momento della diagnosi era compresa tra 3 e 10 anni, e le femmine sono presenti in numero maggiore rispetto ai maschi (8 a 1).

I cani sono stati visitati a distanza di 15 giorni dalla fine del trattamento con la piattaforma REAC, e dopo due mesi dalla fine dello stesso. 8 dei 9 cani sono stati classificati come "normali" o "migliorati", mentre 1 non ha avuto nessun miglioramento nel corso dei 2 mesi (*range* 15 giorni - 2 mesi) successivi alla fine della terapia, ed è stato classificato come "non responder". Il soggetto che non ha risposto alla terapia non è riuscito a perdere peso ed è stato successivamente operato presso l'ODVU con intervento di TPLO.

Dei 9 casi trattati, 5 sono stati classificati come clinicamente "normali", tesi avvalorata dal fatto che la zoppia si è completamente risolta, mantenendo inoltre un *range of motion* dell'articolazione del ginocchio normale. I proprietari hanno riportato un intervallo di tempo per la scomparsa della zoppia e per l'ottenimento del recupero totale di circa due mesi. Nessuno dei 5 cani ha mostrato evidenti segni clinici di atrofia muscolare. La palpazione delle articolazioni colpite, eseguita con l'animale sveglio, si è generalmente dimostrata non dolente mentre il test del cassetto è risultato essere sempre positivo, con la presenza costante di una lieve tumefazione indolore sul lato mediale dell'articolazione. Le radiografie di tutti i 5 cani hanno evidenziato segni di malattia degenerativa articolare.

Dei restanti tre cani classificati come "migliorati" due non hanno mostrato zoppia durante l'esame clinico finale seppure, in uno, era presente ipotrofia muscolare dell'arto interessato. La palpazione delle articolazioni colpite ha rivelato la positività al test del cassetto sia nel gruppo dei "migliorati" (3 soggetti) che nel gruppo dei "non responder" (1 soggetto), ispessimento dell'articolazione ed anomalie radiografiche riconducibili a malattia degenerativa articolare.

Conclusioni

Questi risultati concordano con quanto evidenziato da altri Autori parecchi anni fa (*Strande A., 1971; Pond M., Campbell J.R., 1972*) che suggerivano una gestione non chirurgica di buona parte delle rotture CCL in cani con un peso corporeo inferiore a 15 kg. Tuttavia diversi fattori come l'età, la condizione fisica e il livello di attività sono molto importanti nel prendere la decisione circa l'opzione terapeutica migliore e condizionano il risultato e, quindi, la prognosi, nonostante le tecniche chirurgiche ed i materiali utilizzati siano enormemente migliorati.

I risultati, inoltre, confermano l'importanza del ruolo del peso corporeo nella prognosi in caso di rottura CCL. Gli animali di piccola taglia hanno articolazioni sottoposte a meno eventi traumatici, a differenza di altre razze pesanti ed i migliori risultati ottenuti probabilmente rispecchiano le minori sollecitazioni esercitate su un'articolazione instabile, anche per il ridotto esercizio svolto da queste razze. La bibliografia riferisce che la maggior parte dei cani di piccola taglia richiedono da 4 a 5 mesi per riacquistare la normale funzionalità dell'arto mentre i cani più grandi dai 6 ai 7 mesi. Nella nostra esperienza con la tecnologia REAC i tempi di ripresa sono stati mediamente inferiori a 30 giorni per i cani di piccola taglia e di poco superiori ai 45 giorni in quelli di grossa taglia senza ricorrere ad alcun supporto farmacologico. Le prove radiografiche hanno mostrato a volte segni di malattia degenerativa delle articolazioni più evidenti nei soggetti di grossa taglia. La positività al test del cassetto craniale non sembra essere in linea con la gravità delle lesioni degenerative o con il grado di zoppia. Non appare semplice correlare la gravità della osteoartrite, il grado di instabilità articolare e il grado di zoppia ed utilizzarli come indicatori affidabili nella valutazione clinica del soggetto.

Sulla base della nostra esperienza, seppure limitata nel tempo e nel numero dei casi clinici, la tecnologia REAC può rappresentare un trattamento "avanzato" e innovativo, eventualmente personalizzato con diversi protocolli, per questo tipo di patologia. In particolare, si è osservato una sostanziale correzione dell'assetto posturale, incluse la

cinematica e la coordinazione neuromotoria, accompagnati dalla progressiva riduzione e scomparsa dei segni clinici della patologia. A un anno di distanza dal trattamento le condizioni degli animali si sono mantenute stabili nel tempo e non hanno necessitato di ulteriori applicazioni terapeutiche.

Bibliografia

- 1) Vasseur P.B., Clinical Result following nonoperative management for rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. *Veterineri Surgery* Volume 13, Issue 4 October 1984 Pages 243–246
- 2) Carlin I. Ruptur des ligamentum cruciatum anterius im kniegelenk beim hund. *Arch Wissensch Prakt Teirhalk* 1926:420-3
- 3) Paatsama S. Ligamentous injuries in the canine stifle joint [Thesis]. Helsinki: Royal Veterinary College, 1952.
- 4) Knecht C.D. Evolution of surgical techniques for cruciate ligament rupture in animals. *J Am Anim Hosp Assoc* 1976; 12:717-26
- 5) Strdnde A. Repair of the ruptured cranial cruciate ligament in the dog. Baltimore: Williams and Wilkinsco, 1967
- 6) Cook J.L., Evans R., Conzemius M., Lascelles D., McIlwraith W., Pozzi A., Clegg P., Innes J., Schulz K., Houlton J., Fortier L., Cross A.R., Hayashi K., Kapatkin A., Brown D.C., Stewart A. Proposed definistions and criteria for reporting time frame, outcome and complications for clinical orthopaedic studies in veterinary medicine. *Vet Surg* 2010, 39, 905-908
- 7) Marshall J.L., Olsson S. Instability ofthe knee. *J Bone Joint Surg* 1971; 53A, 1561-70
- 8) Pond M.J., Campbell J.R. The canine stifle joint I. Rupture of the anterior cruciate ligament. An assessment of conservative and surgical treatment. *J Small Anim Pract* 1972;13: 1-10,
- 9) Rubin R.M., Marshall J.L., Wang J. Prevention of knee instability. Experimental model for prosthetic anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 1975; 113:212-36.
- 10) Brown N.P., Bertocci G.E., Marcellin-LittleD.J. Evolution of varying morphological parameters on the biomechanics of a cranial cruciate ligament-deficient or intact canine stifle joint with a computer simulation model. *Am J Vet Res* 2014;75:26-33

- 11) Jerran R.M., Walker A.M. Cranial cruciate ligament injury in the dog: pathophysiology, diagnosis and trattamento. New Zeland Veterinary Journal, 51:4, 149-158
- 12) Lopez M.J., Markel M.D. Anterior cruciate ligament rupture after thermal Treatment in a canine model. Am J Sport Med. 2003 31(2): 164-167
- 13) Whitehair J.G., Vasseur P.B., Willits NH. Epidemiology of cranial cruciate ligament rupture in dogs. JAVMA vol 203 n°7 October 1, 1993.
- 14) Brown N.P., Bertocci G.E., Marcellin-littl D.J. Development of a canine stifle computer model to elalutate cranial cruciate ligament deficiency. Journal of mechanics in medicine and biology. Vol 13 n°2 pag: 1350043 (29 pag)
- 15) Duval J.M., Budsberg S.C., Flo G.L., Sammarco J.L. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. JAVMA, vol 215, n°6, September 15, 1999
- 16) Brown N.P., Bertocci G.E, Marcellin-Little D.J. Influence of biomechanical parameters on cranial cruciate ligament–deficient or –intact canine stifle joints assessed by use of a computer simulation model. AJVR Vol 76, N° 11 November 2015
- 17) Hayashi K., Manley P.A., Muir P. Cranial Cruciate Ligament Pathophysiology in Dogs with Cruciate Disease: A Review. J Am AnimHospAssoc 2004; 40:385-390.
- 18) Harasen G. Canine cranial cruciate ligament rupture in profile: 2002–2007 .CVJ ,vol 49 february 2008
- 19) Greg L.G., Harasen A. retrospective study of 165 cases of rupture of the canine cranial cruciate ligament. Can Vet J Volume 36, April 1995
- 20) Lopez M.J., Markel M.D. Anterior Cruciate Ligament Rupture after Thermal Treatment in a Canine Mode. J Am J Sports Med. 2003 ; 31(2): 164–167
- 21) Comerford E.J., Smith K., Hayashi K. Update on the aetiopathogenesis of canine cranial cruciate ligament Disease. Vet Comp OrthopTraumatol 2011; 24: 91–98

- 22) Duerr F.M., Martin K.W., Rishniw M., Palmer R.H., Selmic L.E. Treatment of canine cranial cruciate ligament disease Vet Comp OrthopTraumatol 2014; 27: 478–483
- 23) Grierson J., Asher L., Grainger K. An investigation into risk factors for bilateral canine cruciate ligament rupture Vet Comp OrthopTraumatol 2011; 24: 192–199
- 24) Aertsens A., Rincon Alvarez J., Ponc C.M., Beaufrère H., Ragetly G.R. Comparison of the tibia plateau angle between small and large dogs with cranial cruciate ligament Disease Vet Comp Orthop Traumatol 2015; 28: 385–390
- 25) Bergh M.S., Sullivan C., Ferrell C.L., Troy J., Budsberg S.C. Systematic Review of Surgical Treatments for Cranial Cruciate Ligament Disease in Dogs J Am Anim Hosp Assoc 2014; 50:315–321.
- 26) Zeltzman P.A., Paré B., Johnson G.M., Zeltzman V., Robbins M.A., Gendreau C.L. Relationship between Age and Tibial Plateau Angle in Dogs with Cranial Cruciate Rupture. J Am Anim Hosp Assoc 2005; 41:117-120.
- 27) Ichinohe T., Kanno N., Harada Y., Yogo T., Tagawa M., Soeta S., Amasaki H., Hara Y. Degenerative changes of the cranial cruciate ligament harvested from dogs with cranial cruciate ligament rupture. J. Vet. Med. Sci. 2015; 77(7): 761–770
- 28) Taylor-Brown F.E., Meeson R.L., Brodbelt D.C., Church D.B., McGreevy P.D., Thomson P.C., O'Neill D.G. Epidemiology of Cranial Cruciate Ligament Disease Diagnosis in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. Veterinary Surgery 2015; 44, 777–783
- 29) Cook J.L. Cranial Cruciate Ligament Disease in Dogs: Biology versus Biomechanics. Veterinary Surgery 2010; 39, 270–277
- 30) Griffon D.J. A Review of the Pathogenesis of Canine Cranial Cruciate Ligament Disease as a Basis for Future Preventive Strategies. Veterinary Surgery 2010; 39, 399–409
- 31) Aragon C.L., Budsberg S.C. Applications of Evidence-Based Medicine: Cranial Cruciate Ligament Injury Repair in the Dog. Veterinary Surgery 2005; 34:93–98

- 32) Adams P., Bolus R., Middleton S., Moores A.P., Grierson J. Influence of signalment on developing cranial cruciate rupture in dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice* 2011; 52, 347–352

Caso clinico n. 1 – Buffo

Segnalamento:

Cane meticcio Maschio, nero focato, circa 1 anno di età, peso 12 kg

Anamnesi:

Arrivato presso l'ODVU, dopo un presunto trauma automobilistico; alla visita clinica evidente frattura esposta di Radio-Ulna sx; terapia antibiotica con Amoxicillina e Ac. Clavulanico (20 mg/kg), meloxicam 0.2 mg/kg e ranitidina 2.5 mg/kg.

Eseguita osteosintesi con fissatore esterno, dopo circa 30 giorni dall'intervento radiograficamente si evidenziava riassorbimento osseo senza produzione di callo osseo.

Sempre presente una zoppia di IV grado (mancato appoggio)

Diagnosi:

mancata unione

Trattamento:

VNPO – VNPPPO - VTO RPR

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione RPR per un totale 9 ore con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

Clinicamente i risultati si potevano apprezzare già al termine della VNPPPO con una diminuzione della claudicazione con graduale ripristino dell'utilizzo dell'arto (inizialmente appoggio in punta e progressivo carico); dopo 15 giorni dalla fine del trattamento locale evidenti modificazioni radiologiche; la rimozione del fissatore

esterno è avvenuta dopo 5 mesi dal termine della terapia. Dopo 3 mesi l'animale non manifesta zoppia.



T0



Dopo due mesi dalla
chirurgia



15 giorni dopo la fine del
trattamento



Due mesi dopo la fine del
trattamento

Caso clinico n. 2 – Pimpa

Segnalamento:

Cane, meticcio, femmina, circa 7 mesi di età, 9.5 kg

Anamnesi:

Presunto trauma da investimento. Alla visita clinica si denotava ferita lacero contusa a livello dello zigomatico di sx e frattura di radio-ulna e sfondamento dell'acetabolo a dx; sottoposta a terapia medica (enrofloxacin 5 mg/kg, meloxicam 0.2 mg/kg e ranitidina 2.5 mg/kg). Intervento di osteosintesi del bacino e osteosintesi del radio-ulna con placca.

Dopo circa una settimana si sono manifestati i primi sintomi di osteomielite trattata con l'aggiunta di clindamicina 11 mg/Kg, senza alcuna risposta. Zoppicatura di IV grado (mancato appoggio). Dopo circa 50 giorni dall'intervento radiograficamente non si evidenziava produzione di callo osseo

Diagnosi:

osteomielite radio-ulna; mancata unione.

Trattamento:

VNPO – VNPPPO - VTO RPR

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione RPR per un totale di 18 ore con sedute ripetute da 30 minuti.

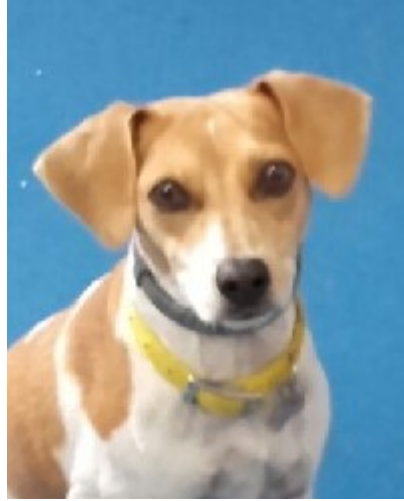
Risultati:

Clinicamente i risultati si potevano apprezzare dopo 30 giorni dal termine della VNPPPO con una diminuzione della claudicazione con completa ripresa funzionale dell'arto (inizialmente appoggio in punta e progressivo carico) nelle successive due

settimane; dopo 90 giorni dalla fine del trattamento locale evidenti modificazioni radiologiche con apposizione di nuovo tessuto osseo seppure disordinato.



T0



T0



Primo giorno terapia VNPPO



30 giorni dall'inizio del trattamento (iniziale appoggio dell'arto)



Due mesi dalla fine del
trattamento



Quattro mesi dalla fine del
trattamento

Caso clinico n. 3 – Luna

Segnalamento:

Pastore tedesco, femmina, 4 mesi

Anamnesi:

trauma da investimento non recente (7-10 giorni), zoppia IV grado (mancato appoggio)

Diagnosi:

frattura completa spirale composta tibia destra

Trattamento:

VNPO - VNPPPO

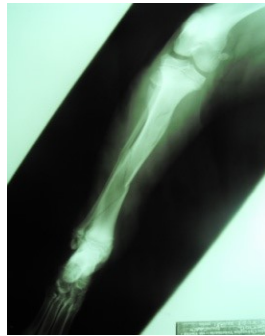
La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra)

Risultati:

dalla quarta seduta scomparsa della tumefazione locale, riduzione del dolore alla manipolazione, progressivo uso dell'arto; dalla decima giornata appoggio completo dell'arto; controllo radiologico a 30 giorni.



T0



T0



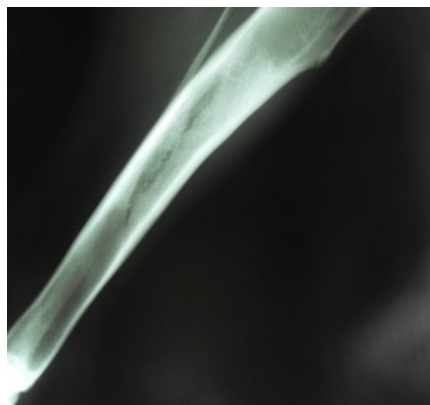
T0



Durante la terapia



Dopo 30 giorni



Dopo 30 giorni

Caso clinico n. 4 - Dinetta

Segnalamento:

Cavallo del Sarcidano, femmina, 7 anni

Anamnesi:

Trauma non recente gomito sinistro

Diagnosi:

Frattura completa terzo prossimale ulna sinistra

Trattamento:

VNPO – VNPPPO- VTO RPR

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione RPR per un totale di "12 ore" con sedute ripetute da 30 minuti.

Risultati:

dalla quarta applicazione VTO progressiva scomparsa della tumefazione, riduzione della zoppia; dalla terza settimana dal termine della terapia scomparsa della zoppia e aumento della mobilità articolare ai movimenti passivi.



T0



T0



Durante il trattamento



Dopo 45 giorni dalla fine della terapia



Dopo 4 mesi dalla fine della terapia

Caso n. 5 – Adriana

Segnalamento:

Cavallo del Sarcidano, femmina, 16 giorni

Anamnesi:

Ha presentato dalla nascita una deformità flessoria grave con contrattura bilaterale dei tendini flessori del dito di III grado, complicata da piaghe sulla superficie dorsale dei nodelli

Diagnosi:

contrattura bilaterale dei tendini flessori del dito di III grado

Trattamento:

VNPO – VNPPPO - VTO

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione RPR per un totale di "12 ore" con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

Dopo due settimane dal termine della terapia, recupero di oltre il 70% delle capacità di appoggio dell'arto, soprattutto a sinistra senza il supporto di supporti rigidi. Ottima cicatrizzazione della piaga dell'anteriore sx che a tre settimane si presenta epitelizzata.



Primo giorno



Durante il trattamento



Durante il trattamento



Dopo 15 giorni di
trattamento



Dopo 15 giorni di
trattamento

Caso clinico n. 6 – Grigio

Segnalamento:

Sella italiano, maschio, 4 anni

Anamnesi:

Al risveglio dopo un'anestesia di 60 minuti, il soggetto ha presentato una sintomatologia riferibile a paralisi del nervo facciale di sinistra che non ha risposto alla terapia medica per una settimana.

Diagnosi: Paralisi del nervo facciale

Trattamento:

VNPO – VNPPPO – VTO RPR

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione RPR per un totale di "4 ore" con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

Dalla terza seduta riduzione della deformità e recupero della funzionalità del labbro superiore ed inferiore avvenuto in una settimana di terapia.



Primo giorno



Inizio trattamento



Durante il trattamento



Dopo tre sedute



Ultimo giorno di terapia



Caso clinico n. 7 – Sissi

Segnalamento:

Sella Italiano, femmina, 20 anni

Anamnesi:

La cavalla presentava da oltre due settimane una tumefazione pastosa, non dolente, fredda interessante tutto l'arto posteriore destro, maggiormente evidente sulla faccia mediale dell'arto. Zoppia di II grado

Diagnosi:

Linfedema idiopatico

Trattamento:

VNPO – VNPPPO – VTO

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione base per un totale di "3 ore" con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

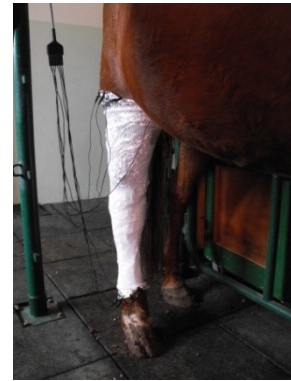
Dalla terza applicazione locale riduzione della tumefazione e recupero della silhouette anatomica della faccia interna della coscia. Scomparsa della zoppia al termine della terapia.



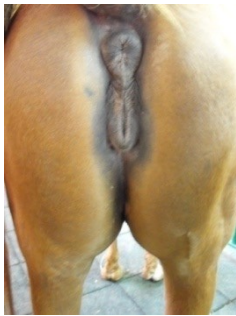
T0



T0



Posizionamento della sonda



Fine terapia



Fine terapia

Caso clinico n. 8 – Jolie

Segnalamento:

Selle française, femmina, 14 anni

Anamnesi:

La cavalla presentava uno sfiancamento inveterato del fondo cieco della sinoviale tendinea della grande sesamoidea dell'anteriore sinistro a livello del nodello.

Diagnosi:

Tenosinovite grande sesamoidea della grande sesamoidea dell'anteriore sinistro (molletta tendinea).

Trattamento:

VNPO – VTO

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione VTO per un totale di "2 ore" con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

Dalla seconda applicazione locale riduzione della tumefazione e recupero del tono della sinoviale tendinea



Prima del trattamento



Posizionamento della
sonda



Fine terapia

Caso clinico n. 9 – Monterra

Segnalamento:

Anglo-Arabo, femmina, 4 anni

Anamnesi:

Da oltre due mesi la cavalla presentava una tumefazione molle elastica sulla punta del garretto, di probabile origine traumatica, non rispondente a terapia medica

Diagnosi:

Bursite calcaneale (cappelletto)

Trattamento:

VNPPPO – VNPPPO – VTO

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente abbiamo applicato la VNPPPO con l'ausilio di una speciale sonda laminare posizionata in zona retro cervicale per un totale di 18 volte suddivise in 6 sedute, svolte in giorni differenti (3 applicazioni a seduta, distanziate 1 ora l'una dall'altra); infine è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione base per un totale di "3 ore" con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

Dalla quarta applicazione locale riduzione della tumefazione che scompariva completamente al termine della terapia.



T0



T0



Posizionamento della sonda



Fine terapia



Fine terapia



Fine terapia

Caso clinico n. 10 - Dingo

Segnalamento:

BWP, maschio, 14 anni

Anamnesi:

Ulcere lineari croniche faccia plantare della regione del pastorale anteriore destro

Diagnosi:

Fissurazioni lineari (ragadi)

Trattamento:

VNPO – VTO

La prima seduta ha previsto inizialmente l'Ottimizzazione Neuro Posturale (VNPO); contestualmente è stato applicato anche il protocollo di biostimolazione RPR per un totale di "2 ore" con sedute ripetute da 15 minuti.

Risultati:

Dalla prima applicazione locale scomparsa dei segni dell'infiammazione. Completa riepitelizzazione al termine della terapia.



T0



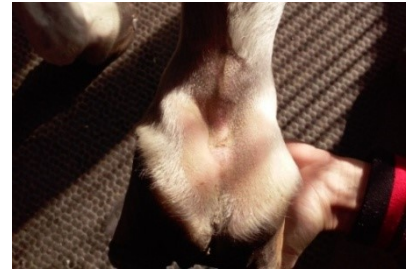
Posizionamento
della sonda



Dopo la prima applicazione



Fine della Terapia



7. Conclusioni

Fin dall'inizio della loro storia, i ricercatori dell'Istituto Rinaldi Fontani hanno indirizzato i loro studi sull'Epigenetica, ossia sulle modificazioni prodotte nell'organismo dagli innumerevoli fattori dell'ambiente, come ad esempio gli stili di vita, l'alimentazione, le sostanze con cui veniamo a contatto, il tipo di attività lavorativa, lo stress cronico. Le modificazioni epigenetiche sono alla base di molte malattie, determinandone sia l'insorgenza che il decorso clinico.

Poiché non esistono reali terapie per contrastare gli effetti negativi delle modifiche epigenetiche sull'organismo, hanno concentrato i loro studi sull'analisi dei disturbi di queste patologie e cercato di individuare una strategia terapeutica sicura, efficace e scientificamente validata.

La tecnologia REAC è il frutto di questa ricerca. L'obiettivo dei trattamenti possibili con la Tecnologia REAC è agire sulla capacità di risposta dell'organismo, portandola gradualmente alla sua massima efficienza ed innescando quindi una graduale ottimizzazione delle funzioni dell'intero organismo, a livello biologico, neurologico, psichico e fisico. La tecnologia REAC consente nuove ottiche e strategie terapeutiche per il recupero e l'ottimizzazione funzionale dell'organismo nei confronti delle modifiche epigenetiche, e quindi delle malattie su base epigenetica, non affrontabili farmacologicamente o con altri mezzi attraverso la messa a punto di specifici protocolli terapeutici.

La tecnologia REAC apre un nuovo percorso della medicina rigenerativa. Come ben spiegato da Ventura e collaboratori in un recentissimo lavoro (Ventura C., Tavazzi L. – *Biophysical signalling from and to the (stem) cells: a novel path to regenerative medicine* - Eur. J. Heart Fail. 2016 Dec; 18(12):1405-1407), i nuovi approcci terapeutici possono svilupparsi nel prossimo futuro sull'impiego di energie fisiche (campi elettromagnetici, vibrazioni, suono, luce) per indirizzare direttamente le cellule

staminali in qualsiasi tessuto del nostro corpo. A causa della natura diffusiva di questa energia, la riprogrammazione cellulare si può verificare *in situ*, aprendo la strada ad una medicina rigenerativa volta alla stimolazione della capacità naturali dei tessuti a sviluppare processi di auto-guarigione, senza la necessità di impianti o di trapianti.

Un primo risultato acquisito con la nostra esperienza è stato quello relativo alla identificazione di specifici protocolli per gli animali e alla variabilità della durata dei trattamenti. Quando vogliamo indurre effetti di modulazione funzionale, proponiamo trattamenti di breve durata; quando, invece, vogliamo indurre modifiche nell'evoluzione cellulare, questo processo di induzione deve essere accompagnato passo passo nel suo sviluppo. Perciò, sono necessari trattamenti di lunga durata.

In tutti i casi trattati si sono osservati segnali di una positiva e globale ottimizzazione delle funzioni nervose. In particolare, si è osservato una sostanziale correzione dell'assetto posturale, inclusa la cinematica, dell'orientamento nello spazio e della coordinazione neuromotoria. Nei casi caratterizzati da tumefazioni o soluzioni di continuo il processo di guarigione è stato rapido ed ottimale.

Gli effetti generali indotti dalla tecnologia REAC possono essere schematicamente riassunti in una migliore coordinazione motoria, in un miglioramento dell'efficienza prestativa, nella velocizzazione dei processi riparativi e in una maggiore resistenza allo stress. Gli effetti locali possono essere riepilogati nel progressivo miglioramento dell'efficienza circolatoria ematica e linfatica, in un'azione decontratturante sulla muscolatura, in un'azione analgesica e antinfiammatoria che favorisce e riduce i tempi di cicatrizzazione. La terapia è indolore, non è invasiva, è di facile e rapida applicazione, non presenta controindicazioni ed è priva di effetti collaterali.

Tutte queste caratteristiche, confermate dalle prove sperimentali eseguite dai diversi gruppi di ricerca in Italia e all'estero, insieme all'esperienza clinica maturata ci consentono di accreditare l'utilizzo della tecnologia REAC nella pratica clinica veterinaria.

Bibliografia

1. Rinaldi S., Fontani V. Radioelectric Asymmetric Conveyer for therapeutic use. EP1301241 (B1) (2000).
2. Rinaldi S., Fontani V. Radioelectric Asymmetric Conveyer for therapeutic use. USA patent 7,333,859 (2001).
3. Cibrian-Uhalte E., Abdelilah-Seyfried S. In Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine 237-243 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
4. Castagna A., Fontani V., Rinaldi S., Mannu P. Radio electric tissue optimization in the treatment of surgical wounds. Clin Cosmet Investig Dermatol 4, 133-137, doi:10.2147/CCID.S24090 (2011).
5. Fontani V., Castagna A., Mannu P., Rinaldi S. Radioelectric asymmetric stimulation of tissues as treatment for post-traumatic injury symptoms. International Journal of General Medicine 4, 627-634, doi:10.2147/IJGM.S24296 (2011).
6. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Fontani V., Ventura C. Radiofrequency energy loop primes cardiac, neuronal, and skeletal muscle differentiation in mouse embryonic stem cells: a new tool for improving tissue regeneration. Cell Transplant 21, 1225-1233, doi: 10.3727/096368911X600966 (2012).
7. Rinaldi S., Maioli M., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S, Margotti M.L., Carta A., Fontani V., Ventura C. Regenerative treatment using a radioelectric asymmetric conveyor as a novel tool in antiaging medicine: an in vitro beta-galactosidase study. Clinical Interventions in Aging 7, 191-194, doi:10.2147/CIA.S33312 (2012).

8. Collodel G., Fioravanti A., Pascarelli N.A., Lamboglia A., Fontani V., Maioli M., Santaniello S., Pigliaru G., Castagna A., Moretti E., Iacoponi F., Rinaldi S., Ventura C. Effects of regenerative radioelectric asymmetric conveyer treatment on human normal and osteoarthritic chondrocytes exposed to IL-1beta. A biochemical and morphological study. *Clinical Interventions in Aging* 8, 309-316, doi:10.2147/CIA.S42229 (2013).
9. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Delitala A., Margotti M.L., Bagella L., Fontani V., Ventura C. Anti-senescence efficacy of radio-electric asymmetric conveyer technology. *AGE*, doi:10.1007/s11357-013-9537-8 (2013).
10. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Gualini S., Cavallini C., Fontani V., Ventura C. Radio electric conveyed fields directly reprogram human dermal skin fibroblasts toward cardiac, neuronal, and skeletal muscle-like lineages. *Cell Transplant* 22, 1227-1235, doi:10.3727/096368912X657297 (2013).
11. Rinaldi S., Iannaccone M., Magi G.E., Costantini E., Castagna A., Sanna Passino E., Maioli M., Fontani V. Physical reparative treatment in reptiles. *BMC Vet Res* 9, 39, doi:10.1186/1746-6148-9-39 (2013).
12. Maioli M., Rinaldi S., Santaniello S., Castagna A., Pigliaru G., Delitala A., Bianchi F., Tremolada C., Fontani V., Ventura C. Radioelectric asymmetric conveyed fields and human adipose-derived stem cells obtained with a nonenzymatic method and device: a novel approach to multipotency. *Cell Transplant* 23, 1489-1500, doi:10.3727/096368913X672037 (2014).
13. Rinaldi S., Maioli M., Pigliaru G., Castagna A., Santaniello S., Basoli V., Fontani V., Ventura C. Stem cell senescence. Effects of REAC technology on telomerase-independent and telomerase-dependent pathways. *Sci Rep* 4, 6373, doi:10.1038/srep06373 (2014).
14. Maioli M., Rinaldi S., Migheli R., Pigliaru G., Rocchitta G., Santaniello S., Basoli V., Castagna A., Fontani V., Ventura C., Serra P.A. Neurological morphofunctional

- differentiation induced by REAC technology in PC12. A neuro protective model for Parkinson's disease. *Sci Rep* 5, 10439, doi:10.1038/srep10439 (2015).
15. Rinaldi S., Mura M., Castagna A., Fontani V. Long-lasting changes in brain activation induced by a single REAC technology pulse in Wi-Fi bands. Randomized double-blind fMRI qualitative study. *Sci Rep* 4, 5668, doi:10.1038/srep05668 (2014).
 16. Zippo A.G., Rinaldi S., Pellegata G., Caramenti G.C., Valente M., Fontani V., Biella G.E. Electrophysiological effects of non-invasive Radio Electric Asymmetric Conveyor (REAC) on thalamocortical neural activities and perturbed experimental conditions. *Sci Rep* 5, 18200, doi:10.1038/srep18200 (2015).
 17. Mannu P., Rinaldi S., Fontani V., Castagna A., Margotti M.L. Radio electric treatment vs. Es-Citalopram in the treatment of panic disorders associated with major depression: an open-label, naturalistic study. *AcupunctElectrother Res* 34, 135-149 (2009).
 18. Castagna A., Rinaldi S., Fontani V., Aravagli L., Mannu P., Margotti M.L. Does osteoarthritis of the knee also have a psychogenic component? Psycho-emotional treatment with a radio-electric device vs. intra-articular injection of sodium hyaluronate: an open-label, naturalistic study. *Acupuncture & electrotherapeutics research* 35, 1-16 (2010).
 19. Rinaldi S., Fontani V., Aravagli L., Margotti M.L. Psychological and symptomatic stress-related disorders with radio-electric treatment: psychometric evaluation. *Stress and Health* 26, 350-358, doi:10.1002/smi.1298 (2010).
 20. Rinaldi S., Fontani V., Aravagli L., Mannu P. Psychometric evaluation of a radio electric auricular treatment for stress related disorders: a double-blinded, placebo-controlled controlled pilot study. *Health and Quality of Life Outcomes* 8, 31, doi:10.1186/1477-7525-8-31 (2010).
 21. Rinaldi S., Fontani V., Moretti E., Rosettani B., Aravagli L., Saragò G., Collodel G. A new approach on stress-related depression & anxiety: Neuro-Psycho-Physical-

- Optimization with Radio Electric Asymmetric-Conveyer. The Indian journal of medicalresearch 132, 189-194 (2010).
22. Castagna A., Rinaldi S., Fontani V., Mannu P. Radioelectric asymmetric brain stimulation and lingual apex repositioning in patients with atypical deglutition. Journal of Multidisciplinary Healthcare 4, 209-213, doi:10.2147/JMDH.S22830 (2011).
 23. Fontani V., Mannu P., Castagna A., Rinaldi S. Social anxiety disorder: radio electric asymmetric conveyor brain stimulation versus sertraline. Patient Prefer Adherence 5, 581-586, doi:10.2147/PPA.S27409 (2011).
 24. Fontani V., Rinaldi S., Aravagli L., Mannu P., Castagna A., Margotti M.L. Noninvasive radioelectric asymmetric brain stimulation in the treatment of stress-related pain and physical problems: psychometric evaluation in a randomized, single-blind placebo-controlled, naturalistic study. International Journal of General Medicine 4, 681-686, doi:10.2147/IJGM.S24628 (2011).
 25. Mannu P., Rinaldi S., Fontani V., Castagna A. Long-term treatment of bipolar disorder with a radioelectric asymmetric conveyor. Neuropsychiatric Disease and Treatment 7, 373-379, doi:10.2147/NDT.S22007 (2011).
 26. Mannu P., Rinaldi S., Fontani V., Castagna A. Radio electric asymmetric brain stimulation in the treatment of behavioral and psychiatric symptoms in Alzheimer disease. Clinical Interventions in Aging 6, 207-211, doi:10.2147/CIA.S23394 (2011).
 27. Mannu P., Rinaldi S., Fontani V., Castagna A., Margotti M.L. Non invasive brain stimulation by radioelectric asymmetric conveyor in the treatment of agoraphobia: open-label, naturalistic study. Patient Prefer Adherence 5, 575-580, doi:10.2147/PPA.S26594 (2011).
 28. Olivieri E.B., Vecchiato C., Ignaccolo N., Mannu P., Castagna A., Aravagli L., Fontani V., Rinaldi S. Radioelectric brain stimulation in the treatment of generalized anxiety disorder with comorbid major depression in a psychiatric

- hospital: a pilot study. *Neuropsychiatr Dis Treat* 7, 449-455, doi:10.2147/NDT.S23420 ndt-7-449 [pii] (2011).
29. Rinaldi S., Fontani V., Aravagli L., Mannu P., Castagna A., Margotti M.L., Rosettani B. Stress-related psycho-physiological disorders: randomized single blind placebo controlled naturalistic study of psychometric evaluation using a radio electric asymmetric treatment. *Health and Quality of Life Outcomes* 9, 54, doi:10.1186/1477-7525-9-54 (2011).
30. Rinaldi S., Fontani V., Castagna A. Brain activity modification produced by a single radioelectric asymmetric brain stimulation pulse: a new tool for neuropsychiatric treatments. Preliminary fMRI study. *Neuropsychiatr Dis Treat* 7, 649-654, doi:10.2147/NDT.S26123 (2011).
31. Fontani V., Aravagli L., Margotti M.L., Castagna A., Mannu P., Rinaldi S. Neuro psychophysical optimization by REAC technology in the treatment of: sense of stress and confusion. Psychometric evaluation in a randomized, single blind, sham-controlled naturalistic study. *Patient Prefer Adherence* 6, 195-199, doi:10.2147/PPA.S29734 (2012).
32. Fontani V., Rinaldi S., Castagna A., Margotti M. L. Non invasive radioelectric asymmetric conveyor brain stimulation treatment improves balance in individuals over 65 suffering from neurological diseases: pilot study. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 8, 73-78, doi:10.2147/TCRM.S28812 (2012).
33. Mura M., Castagna A., Fontani V., Rinaldi, S. Preliminary pilot fMRI study of neuropostural optimization with a non invasive asymmetric radioelectric brain stimulation protocol in functional dysmetria. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 8, 149-154, doi:10.2147/NDT.S29971 (2012).
34. Olazarán J., González B., López-Álvarez J., Castagna A., Osa-Ruiz E., Herrero-Cano V., Agüera-Ortiz L., Rinaldi S., Martínez-Martín P. Motor Effects of REAC in

- Advanced Alzheimer's Disease: Results From a Pilot Trial. *J Alzheimers Dis* 36, 297-302, doi:10.3233/JAD-130077 (2013).
35. Olazarán J., González B., Osa-Ruiz E., Felipe-Ruiz S., Boyano I., Fontani V., Castagna A., Mendoza C., Zea M.A., Frades B., Rinaldi S., Martínez-Martín P. Motor effects of radio electric asymmetric conveyer in Alzheimer's disease: results from a cross-over trial. *J AlzheimersDis* 42, 325-332, doi:10.3233/JAD-140417 (2014).
36. Rinaldi S., Calzà L., Giardino L., Biella G.E., Zippo A.G., Fontani V. Radio electric asymmetric conveyer: a novel neuromodulation technology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in Psychiatry* 6, 22, doi:10.3389/fpsy.2015.00022 (2015).
37. Rinaldi S., Castagna A. – Comunicazioni personali (2016)
38. Sanna Passino E., Rinaldi S. *Reac Technology and Veterinary Medicine: A Horizon of Opportunities*. *SOJ Veterinary Sciences* (2016) (SOJVS-16-LE-130 published on line www.symbiosisonline.org: 21 December, 2016)

Ulteriori approfondimenti bibliografici in:

<http://www.irf.it/2016/it/pubblicazioni.html>

Documentazione video consultabile all'indirizzo:

http://ospedaleveterinario.uniss.it/?page_id=472