



**Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”
Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Dottorato di Ricerca in Neuroscienze
XXII Ciclo**

**Coordinatore:
Prof. G. Bernardi**

**EFFETTO DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI
A FREQUENZA ESTREMAMENTE BASSA SUL
DIFFERENZIAMENTO NEURONALE DI
CELLULE AtT20 E NTERA-2**

Dottorando:
Dott.ssa Flavia De Carlo

Relatore:
Prof. P. Calissano

Tutor:
Dott.ssa A. Lisi

A.A. 2009/2010

INDICE

INTRODUZIONE	pg.5
1. AtT20: primo modello cellulare	pg.5
1.1. IPOFISI.....	pg.5
1.2. Asse IPOTALAMO-IPOFISARIO.....	pg.6
1.3. L'adenoipofisi.....	pg.8
1.3.1. L'ormone adrenocorticotropo ACTH.....	pg.8
1.4. La linea cellulare AtT20 ed il clone AtT20 D16V	pg.10
1.4.1. Differenziamento delle AtT20 D16V	pg.10
1.4.2. Lo ione calcio ed i canali del calcio voltaggio dipendenti.....	pg.12
2. NT2: secondo modello cellulare	pg.14
2.1. Teratocarcinomi e teratomi.....	pg.14
2.2. Cellule EC ed ES.....	pg.14
2.3. Le linee TERA ed il clone NTERA2.....	pg.15
2.3.1. Differenziamento delle NT2/D1.....	pg.16
2.3.2. Protocolli di differenziamento: metodo per colture primarie di neuroni e metodo di aggregazione cellulare.....	pg.20
2.3.3. Applicazioni della linea NT2.....	pg.21
3. Campi magnetici e sistemi biologici	pg.24
3.1. La vita e l'elettromagnetismo.....	pg.24
3.2. Campi elettrici, campi magnetici, campi elettromagnetici: caratteristiche generali.....	pg.25

3.3. Elettricità e magnetismo: sorgenti artificiali di origine antropica	pg.29
3.4. L'interazione per risonanza.....	pg.31
3.5. Gli effetti dei campi ELF sulla cellula.....	pg.32
MATERIALI E METODI.....	pg.35
Materiali: AtT20.....	pg.35
Materiali: NT2.....	pg.35
Tamponi e soluzioni: AtT20.....	pg.36
Tamponi e soluzioni: NT2.....	pg.39
Metodi: AtT20.....	pg.39
Coltura.....	pg.39
Apparati di esposizione ai campi ELF-EMF.....	pg.40
<i>Apparato di esposizione acuta per microscopia a epifluorescenza.....</i>	<i>pg.40</i>
<i>Apparato di esposizione continua al campo magnetico.....</i>	<i>pg.41</i>
Analisi della concentrazione del Calcio intracellulare e del pH con sonde fluorescenti indo-1 e SNARF-1.....	pg.42
<i>Metodo raziometrico.....</i>	<i>pg.42</i>
<i>Sonde.....</i>	<i>pg.42</i>
<i>Marcatura con le sonde fluorescenti.....</i>	<i>pg.44</i>
<i>Misurazione della fluorescenza.....</i>	<i>pg.44</i>
<i>Valutazione off-line dei dati e analisi statistica.....</i>	<i>pg.45</i>
SEM (Scanning Electron Microscopy).....	pg.45
Microscopia confocale.....	pg.46
TEM (Transmission Electron Microscopy).....	pg.47
Estrazione dell'RNA.....	pg.47
Trascrizione inversa dell'RNA.....	pg.49
Amplificazione mediante PCR semiquantitativa.....	pg.50
Metodi: NT2.....	pg.51
Coltura: espansione e differenziamento.....	pg.51
Apparato di esposizione	pg.52

<i>Apparato di esposizione continua al campo magnetico</i>	pg.52
Analisi al microscopio ottico.....	pg. 53
Analisi della proliferazione cellulare.....	pg.54
Estrazione dell'RNA.....	pg.54
Trascrizione inversa dell'RNA.....	pg.55
Amplificazione del DNA mediante PCR REAL-TIME.....	pg.55
RISULTATI	pg.58
1. AtT20: primo modello cellulare.....	pg.59
1.1. Analisi dell'effetto dell'esposizione al campo magnetico sulla variazione del [Ca ²⁺] _i e del pH _i	pg.59
1.2. Analisi morfologica e organizzazione del citoscheletro in cellule AtT20 esposte al campo ELF-EMF	pg.61
1.3. Analisi mediante immunofluorescenza indiretta dell'effetto del campo di 50Hz, 2mT sulla distribuzione della proteina NF200.....	pg.63
1.4. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione di NF200.....	pg.65
1.5. Analisi della distribuzione della sinaptofisina.....	pg.66
1.6. Effetto della esposizione ai campi ELF-EMF sulla distribuzione delle vescicole secretorie.....	pg.68
2. NT2: secondo modello cellulare.....	pg.69
2.1. Analisi morfologica delle cellule NT2 esposte ad un campo di 29Hz, 1mT.....	pg.69
2.2. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria.....	pg.71
2.3. Analisi quantitativa mediante Real Time PCR dell'espressione dei marcatori neuronali in cellule esposte al campo di 29Hz, 1mT.....	pg.72
DISCUSSIONE	pg.74
REFERENZE	pg.80

INTRODUZIONE

1. AtT20/D16V: primo modello cellulare

1.1. IPOFISI

Nell'uomo l'**ipofisi** o ghiandola **pituitaria**, è una ghiandola endocrina situata alla base del cranio, nella sella turcica dell'osso sfenoide. E' connessa alla base dell'encefalo in corrispondenza della regione ipotalamica mediante il peduncolo ipofisario. L'ipofisi è costituita da due lobi che sono in realtà due ghiandole ben distinte per origine embriologica, struttura e funzione; esse controllano attraverso la secrezione di numerosi ormoni, l'attività endocrina e metabolica di tutto l'organismo. Si possono distinguere un lobo anteriore (adenoipofisi) ed un lobo posteriore (neuroipofisi), divisi da una *pars intermedia*, piccola e poco vascolarizzata (Fig.1). L'adenoipofisi deriva embriologicamente da un'estroflessione dell'epitelio faringeo (tasca di Rathke) ed è così chiamata perché costituita da un tessuto tipicamente ghiandolare, le cui cellule sono circondate da una fitta rete di sinusoidi sanguigni ampiamente fenestrati. La neuroipofisi è invece di natura esclusivamente nervosa, come prova la sua origine embriologica che è comune con le strutture ipotalamiche. Appartenenti funzionalmente alla neuroipofisi si considerano anche i nuclei ipotalamici sopraottico e paraventricolare nonché le fibre nervose che da essi discendono, lungo il peduncolo ipofisario, fino al corpo della ghiandola (Kandel, 1994; Casella e Taglietti, 1996).

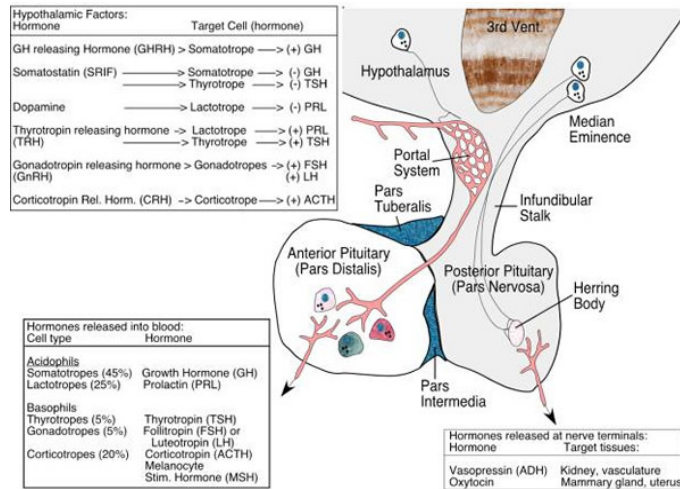


Fig.1. Ipofisi anteriore e posteriore connesse mediante il peduncolo ipofisario all'ipotalamo. Nei riquadri sono riassunti i fattori ipotalamici e gli ormoni rilasciati dall'adenopofisi e a livello della neuroipofisi <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/345>

1.2. Asse IPOTALAMO-IPOFISARIO

Molti neuroni dell'ipotalamo funzionano come trasduttori neuroendocrini, convertono cioè informazioni nervose in informazioni ormonali. Questi neuroni possiedono un duplice ruolo, quello di cellule nervose, che ricevono e trasmettono segnali elettrici, e di cellule endocrine che liberano i loro prodotti di secrezione nel torrente circolatorio. Questi neuroni detti *peptidergici* hanno la proprietà di sintetizzare e secernere peptidi ed in generale liberano più di un peptide. In alcuni di questi neuroni i peptidi vengono liberati a livello sinaptico e agiscono quindi come neurotrasmettitori; in altri neuroni invece questi ormoni vengono immessi in circolo e agiscono su cellule bersaglio situate a distanza.

Una delle principali funzioni dell'ipotalamo è il controllo del sistema endocrino. Esso viene svolto in due modi: (1) direttamente, con la secrezione di prodotti neuroendocrini nel circolo sistemico attraverso i vasi della *neuroipofisi* e (2) indirettamente, con la secrezione

di ormoni regolatori riversati nei vasi sanguigni, sistema portale ipotalamo-ipofisario, dell'*adenoipofisi*. Gli ormoni regolatori ipotalamici, liberanti o inibenti, controllano la sintesi degli ormoni dell'ipofisi anteriore e la loro liberazione nella circolazione sistemica.

Ciascun tipo di controllo endocrino è mediato da una classe distinta di neuroni neuroendocrini peptidergici. In entrambe le classi i peptidi precursori vengono prodotti nel soma ed immagazzinati in vescicole secretorie che vengono trasportate lungo l'assone fino alle terminazioni dove vengono liberate a seguito della stimolazione del neurone.

I *neuroni magnocellulari* si trovano nei nuclei paraventricolare e sopraottico. Per mezzo dell'ipofisi, una parte di questi neuroni libera nel circolo sistemico l'*ossitocina* (responsabile della contrazione uterina ed dell'eiezione del latte), mentre altri liberano la *vasopressina* (vasocostrizione, riassorbimento renale dell'acqua).

I *neuroni parvicellulari* si trovano in diverse regioni ipotalamiche: la regione basale mediale, i nuclei arcuato e tuberale, la regione periventricolare e i nuclei preottico e paraventricolare. Questi neuroni liberano i loro prodotti nel sistema portale ipotalamo-ipofisario e stimolano o inibiscono la liberazione di ormoni da parte dell'adenoipofisi. Ad esempio GHRH stimola la liberazione dell'ormone della crescita (ormone somatotropo) da parte dell'ipofisi anteriore mentre la somatostatina ha effetto contrario. La lista completa è riportata in tabella 1 (Kandel, 1994).

Sostanza ipotalamica	Ormone dell'Adenoipofisi
<i>Liberante</i>	
Ormone liberante la tirotropina (TRH)	Tirotropina, prolattina
Ormone liberante la corticotropina (CRH)	Adrenocorticotropina, β -lipotropina
Ormone liberante le gonadotropine (GnRH)	LH, FSH
Ormone liberante l'ormone della crescita (GHRH)	GH
Fattore liberante la prolattina (PRF)	Prolattina
Fattore liberante l'ormone melanocita-stimolante (MRF)	MSH, β -endorfine
<i>Inibente</i>	
Ormone inibente la liberazione di prolattina (PIH), dopamina	Prolattina
Ormone inibente la liberazione dell'ormone della crescita (GIH, somatostatina)	GH, tirotropina
Ormone inibente la liberazione dell'ormone melanocita-stimolante (MIF)	MSH

Tabella 1. Ormoni di secrezione ipotalamica che agiscono come fattori stimolanti o inibenti la secrezione di ormoni da parte della ipofisi anteriore

1.3. L'adenoipofisi

I sei principali ormoni elaborati dall'adenoipofisi sono l'ormone della crescita (GH), la prolattina (PRL), l'adrenocorticotropina (ACTH), la tirotropina (TSH), l'ormone follicolo stimolante (FSH) e luteinizzante (LH) ed i loro target sono schematizzati in figura 2.

Lo spettro di funzioni controllate da questi ormoni è molto ampio; ad esempio l'ormone della crescita ha il ruolo di stimolare l'accrescimento corporeo e la sua azione si estende allo sviluppo di quasi tutti i tessuti ed in particolare ossa, muscoli e visceri (Casella e Taglietti, 1996).

1.3.1. L'ormone adrenocorticotropo ACTH

L'adrenocorticotropina è un ormone trofico dell'adenoipofisi. Come per altri ormoni peptidici, il frammento biologicamente attivo è prodotto a partire da un precursore. In questo caso specifico ACTH, MSH e β -lipotropina risultano essere prodotti a partire dallo stesso progenitore comune, la pro-opi-melanocortina.

L'ACTH agisce sulla corteccia surrenale stimolando la produzione di ormoni corticosteroidi glucoattivi, il più importante il cortisolo. La sua produzione è regolata dai neuroni parvicellulari che liberano l'ormone CRH controllandone la liberazione in funzione della richiesta tissutale di corticosteroidi. La regolazione avviene secondo il principio della "controreazione ormonale" secondo il quale la produzione ipotalamica di CRH ed adenoipofisaria di ACTH sono inibite da un aumento della concentrazione dell'ormone cortisolo. La produzione basale di ACTH non è costante ma avviene ad ondate la cui intensità e frequenza varia secondo il ritmo circadiano (Casella e Taglietti, 1996).

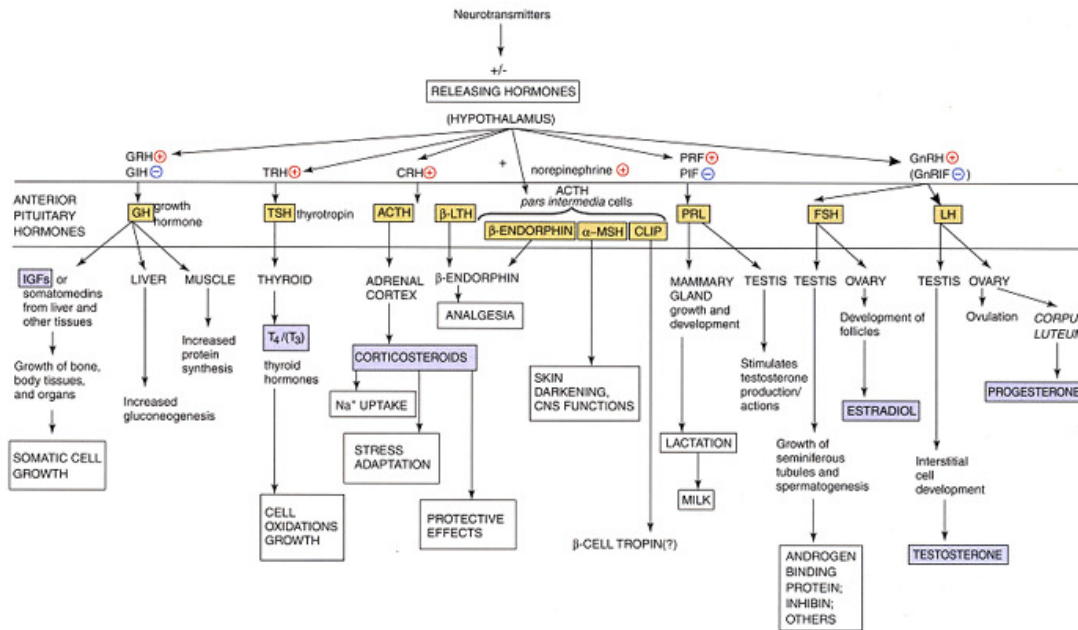


Fig. 2. I principali ormoni rilasciati dall'adenoipofisi ed i relativi target.

<http://flipper.diff.org/app/pathways/info/345>

1.4. Linea cellulare AtT20 ed il clone AtT20 D16V

La linea cellulare AtT20 è stata clonata da Sato e colleghi nel 1966 (Yasamura et al, 1966) a partire da una coltura precedente di tumore murino della ghiandola pituitaria (Buonassisi et al, 1962). Originariamente il tumore si sviluppò in topi del ceppo LAF₁ i quali erano stati esposti a radiazioni ionizzanti generate durante test con armi atomiche (Upton et al, 1953). Il subclone D16V è stato invece selezionato da Herbert nel 1978.

La linea cellulare AtT20 era generalmente considerata essere formata da cellule corticotrope pituitarie oncogenicamente trasformate. Studi sia morfologici che biochimici hanno mostrato invece che le AtT20 possono essere considerate un modello di neurone peptidergico (Tooze et al, 1989).

1.4.1. Differenziamento delle AtT20 D16V

Le cellule della linea AtT20 D16V una volta piastrate ad una concentrazione adeguata in 24-28 ore aderiscono al substrato e si appiattiscono. Nell'arco di 3-5 giorni si formano lunghi processi che assomigliano a neuriti e spesso i coni di accrescimento entrano in contatto con il soma di altre cellule o con neuriti limitrofi. Analisi ultrastrutturali hanno mostrato che il cono di accrescimento delle cellule AtT20 è essenzialmente lo stesso di quello di colture di neuroni, anche se solo di rado si osservano i cambiamenti strutturali che portano alla formazione delle sinapsi. Gli organelli che si osservano a livello delle estremità dei neuriti includono mitocondri, endosomi precoci, lisosomi, strutture autofagiche, reticolo endoplasmatico liscio, forse deposito del Ca²⁺, e vescicole elettron-dense contenenti ACTH. Mancano invece il reticolo endoplasmatico rugoso ed il Golgi.

Le cellule AtT20 differenziate esprimono inoltre i caratteristici marcatori di tipo neuronale. Oltre a sintetizzare i filamenti intermedi presenti esclusivamente nei neuroni, i neurofilamenti, queste cellule esprimono la sinapsina, proteina periferica delle piccole vescicole sinaptiche (SSV: small synaptic vesicles) delle terminazioni nervose. Inoltre si è riscontrata l'espressione delle proteine associate ai microtubuli (MAPs: microtubule-associated proteins), nelle forme MAP2 e tau, che sono fortemente espresse nelle cellule neuronali. Nelle sezioni crioconservate di ipofisi solo la neuroipofisi risulta essere positiva

alla marcatura con anticorpi verso i peptidi dei neurofilamenti e tau mentre le cellule endocrine dell'adenoipofisi sono negative (Tooze et al, 1989).

I costituenti principali del citoscheletro cellulare sono rappresentati da tre tipi di elementi fibrillari di diverso spessore: i microtubuli, i filamenti intermedi e i microfilamenti con le proteine che vi sono rispettivamente associate. Nei mammiferi i filamenti intermedi (IF: intermediate filaments) presentano un grado inusuale di specificità tissutale e sono utilizzati come marcatori del differenziamento cellulare. Appartengono alla famiglia di geni delle citocheratine, sono classificati in 6 tipi e presentano strutture di omologia che consentono la formazione di strutture a doppia elica. Alla classe I e II appartengono le cheratine acide e basiche, alla III la vimentina, la desmina, la proteina acida fibrillare della glia, la periferina, alla IV classe i neurofilamenti e l'internessina, alla V la laminina nucleare ed alla VI la nestina.

I neurofilamenti (NF: neurofilaments) sono il IV tipo di filamenti intermedi, sono specifici per le cellule neuronali e i loro geni presentano una simile struttura esonica ed intronica (Lee and Cleveland, 1996; Gilyarov, 2008). I NF hanno un diametro di 10nm e sono costituiti da fibre che si dispongono a spirale le une attorno alle altre e formano avvolgimenti di crescente spessore. Le unità più sottili sono monomeri che formano eterodimeri; questi a loro volta si assemblano in complessi tetramerici, i proto filamenti, che danno il neuro filamento. I NF in fine possono arrivare alla lunghezza di centinaia di μm . (Kandel, 1994). Il tipo principale di neurofilamento presente nelle fibre mieliniche è formato da tre subunità proteiche conosciute come tripletta NF che sono codificate da geni separati. Le subunità sono ad alto (NF-H; H: *heavy*), medio (NF-M; M: *middle*) e basso (NF-L; L: *light*) peso molecolare, corrispondenti a 200 kDa, 130-170 kDa e 60-70 kDa, (Lee and Cleveland, 1996).

Come precedentemente spiegato, gli ormoni ipotalamici che regolano l'attività dell'adenoipofisi vengono prodotti nel corpo cellulare, trasportati lungo l'assone e accumulati a livello delle terminazioni nervose dei neuroni peptidergici all'interno di vescicole. I neurotrasmettitori vengono liberati da piccole vescicole di 40-50nm; i peptidi sono invece immagazzinati in grandi vescicole, spesso chiamate a centro denso (elettron-dense con microscopia elettronica), con diametro di 70-200nm, che sono la controparte neuronale dei granuli secretori delle cellule endocrine (Kandel, 1994; Cameron et al,

1993). La fusione avviene per riconoscimento tra proteine localizzate sulle membrane della vescicola e del bottone sinaptico; in seguito si ha la formazione del poro di fusione che mette in comunicazione il lume della vescicola con lo spazio extracellulare. Le proteine che potrebbero rappresentare il substrato per la fusione sono la sinaptofisina e la sinaptotagmina. La sinaptofisina costituisce il 6% delle proteine totali della membrana vescicolare e possiede tratti ad α -elica che si pensa possano attraversare da parete a parete la membrana e formare canali (Kandel, 1994). Durante il differenziamento dei neuroni in vitro la sinaptofisina è presente ancor prima che venga stabilita polarità neuronale. Con la formazione degli assoni e dei dendriti le proteine delle vescicole si distribuiscono in entrambi i processi e progressivamente si concentrano negli assoni. Quando le sinapsi sono formate le vescicole sinaptofisina e sinapsina positive si accumulano al livello della membrana presinaptica (Cameron et al, 1993; Quatacker et al, 1998). Anche la sinaptotagmina possiede porzioni di catena proteica ad α -elica e come la sinaptofisina sono responsive all'aumento della concentrazione del calcio. Entrambe, infatti, legano la calmodulina e contengono strutture omologhe alla regione regolatrice della proteina chinasi C (Kandel, 1994).

1.4.2. Lo ione calcio ed i canali del calcio voltaggio dipendenti

Negli ultimi 20 anni è diventato evidente che le cascate del segnale governate dal calcio siano importanti per il controllo di attività cellulari come la crescita cellulare, il differenziamento, l'eccitabilità, la contrazione e l'esocitosi. Le variazioni della concentrazione intracellulare di calcio ($[Ca^{2+}]_i$) avvengono spontaneamente o in risposta alla stimolazione da parte di un agonista. Queste oscillazioni sono dovute sia all'ingresso di Ca^{2+} dall'esterno e/o dal rilascio dai compartimenti interni. In molti tipi cellulari le oscillazioni del calcio sono dovute al funzionamento di entrambi i meccanismi. I pathway coinvolti nella regolazione dell'ingresso del Ca^{2+} includono i canali del calcio voltaggio dipendenti (VGCCs: *voltage gated calcium channels*), i canali associati a recettori, quelli attivati da secondi messaggeri o di tipo meccanico. Anche l'uscita del calcio dagli *storage* intracellulari avviene attraverso canali del calcio e tra questi troviamo i canali sensibili all'inositolo 1,4,5- trifosfato [$Ins(1,4,5)P_3$] e alla ryanodina (Tsien and Tsien, 1990).

I canali del calcio voltaggio dipendenti mediano l'ingresso del calcio in risposta alla depolarizzazione della membrana. Studi di elettrofisiologia hanno dimostrato la presenza di differenti correnti che sono state denominate di tipo L, N, P, Q, R, T e ad esse sono associati canali che vengono attivati e inattivati a specifici valori di voltaggio. I VGCC, in base a studi di omologia di sequenza della loro principale subunità (α_1), furono inizialmente suddivisi in dieci gruppi (A-I). Più recentemente è stata proposta una nomenclatura che divide i canali del calcio in tre famiglie strutturalmente e funzionalmente correlate (Ca_v1 , 2 e 3) (Ertel et al, 2000). Alla famiglia Ca_v1 appartengono i canali di tipo L (*long lasting*) identificati nella muscolatura striata (cardiaca e scheletrica) e liscia, nelle cellule endocrine e nei neuroni; in questi tipi cellulari mediando rispettivamente la contrazione muscolare, la secrezione degli ormoni e la trascrizione genica. Alla famiglia Ca_v2 appartengono i canali neuronali di tipo P (*Purkinje*), Q, N (*neural*), R che sono localizzati a livello delle terminazioni nervose, dove consentendo il rilascio dei neurotrasmettitori, nei dendriti e nel soma. Per finire i canali di tipo T (*transient*) sono raggruppati nella famiglia Ca_v3 e, al pari degli L-type, sono presenti anche in cellule non neuronali, come quelle della muscolatura cardiaca e scheletrica (Catterall, 2000).

Nella adenoipofisi le cellule gonadotrope (Stutzin et al, 1989), corticotrope (Marchetti et al, 1987), somatotrope, lactotrope (Lewis et al, 1988) e le linee cellulari pituitarie (Dubinsky and Oxford, 1984) possiedono sia i canali di tipo T che quelli di tipo L.

2. NT2: secondo modello cellulare

2.1. Teratocarcinomi e teratomi

I tumori dei tessuti embrionali, il teratocarcinoma ed il teratoma, si possono formare in diversi siti ma essi colpiscono principalmente la linea germinale e quindi le gonadi. Nell'ovaio si manifestano spesso come cisti dermoidi benigne, mentre nel testicolo sono solidi e generalmente maligni (Andrews, 1988).

Storicamente il termine teratocarcinoma era usato dai patologi per definire in maniera specifica un tumore germinale maligno del testicolo composto da teratoma e carcinoma embrionale. Se lo si vuole definire però in maniera più precisa, il teratocarcinoma è un tumore maligno che comprende sia tessuti somatici, quelli che possono essere trovati normalmente nelle membrane extra-embryonali (trofoblasto e sacco vitellino), che cellule staminali indifferenziate maligne, identificate come *EC (embryonal carcinoma) cells*. Queste cellule sono considerate le controparti maligne delle staminali embrionali o *ES (embryonal stem) cells*.

Il termine teratoma invece deve essere applicato solo ai tumori benigni in quanto formati da tessuto somatico e dai suoi precursori indifferenziati (fetali) derivati da più di uno dei tre foglietti germinali (ectoderma, mesoderma ed endoderma). I teratomi maturi sono formati da tessuto somatico con cellule non proliferanti, mentre gli immaturi da tessuto simil fetale proliferante (Andrews, 1988).

2.2. Cellule *EC (carcinoma embrionale)* ed *ES (staminale embrionale)*

Come precedentemente detto i teratocarcinomi sono tumori altamente maligni che contengono tessuto somatico disorganizzato e cellule extraembryonali insieme a nidi di cellule del carcinoma embrionale. Le EC sono le cellule staminali pluripotenti di questi tumori e sono capaci di auto-mantenimento e differenziamento in un ampio spettro di tipi cellulari (Andrews et al, 2005). Le cellule differenziate non sono però maligne; questa

caratteristica è propria delle cellule EC che una volta trapiantate invece in topi ospite sono in grado di formare un nuovo tumore (Kleinsmith and Pierce, 1964).

Ampi studi effettuati durante gli anni '70 mostrarono una forte correlazione tra EC e cellule ICM (*inner cell mass*) pluripotenti della blastocisti di embrione precoce di topo (Jacob, 1978). Questo, insieme alla comprensione di come coltivare e caratterizzare le EC *in vitro*, culminò nell'isolamento di una linea cellule di staminali embrionali (ES) di topo ottenuta dall'espanto di cellule dall'ICM dell'embrione (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Le EC umane e murine differiscono le une dalle altre per certi aspetti ma hanno anche caratteristiche in comune. Per esempio la loro morfologia e i *pattern* di crescita sono simili in quanto entrambe tendono a crescere in *cluster* compatti di cellule con poco citoplasma e grandi nucleoli; inoltre entrambe esprimono alti livelli di fosfatasi alcalina. Differente è invece il *pattern* d'espressione degli antigeni di superficie, come la propensione per le cellule EC umane ma non murine a differenziare in trofoectoderma (Andrews et al, 2005).

Le EC umane esprimono tipicamente gli antigeni glicolipidici SSEA3 (*stage-specific embryonic antigen-3*) e SSEA4 (*stage-specific embryonic antigen-4*), gli antigeni proteoglicanici ad alto peso molecolare TRA-1-60, TRA-1-81 (*keraten sulphate related antigens*), GCTM2 (*keratin sulphate proteoglycan*) e l'antigene proteico Thy1 e MHC di classe I. Contrariamente alle precedenti le EC ed ES murine esprimono SSEA1 ma non gli altri marker (Andrews et al, 1996). E' da sottolineare che quando furono alla fine ottenute cellule ES umane dall'espanto di ICM da blastocisti umane, le loro proprietà risultarono essere simili a quelle delle EC umane e distinte però da quelle delle ES murine (Thomson et al, 1998; Draper et al, 2002). Anche le cellule dell'ICM umano esprimono un simile pattern di antigeni di superficie di quello trovato nelle EC ed ES umane. Tuttavia le EC ed ES umane, come le EC ed ES murine, esprimono il fattore di trascrizione OCT4 il quale è *down* regolato durante il differenziamento (Niwa et al, 2000).

2.3. Le linee TERA ed il clone NTERA2

Le linee cellulari di teratocarcinoma umano furono isolate per la prima volta negli anni '50 da xenotrapianti in tasche guanciali di criceto (Pierce et al, 1957). Diverse altre linee

furono successivamente stabilite *in vitro* durante gli anni '70 in particolare TERA1 e TERA2 (Forgh and Tremple, 1975). Molte di queste linee cellulari mostravano una ridotta capacità di differenziamento ma fornirono le basi per l'identificazione delle cellule EC umane. Alla fine furono ottenute diverse linee cellulari di EC in grado di differenziare tra cui ironicamente vennero nuovamente isolate le TERA2 (Andrews et al, 1984); questa è una delle linee di teratocarcinoma più antiche ancora esistenti le cui caratteristiche di pluripotenza non furono al momento della sua scoperta riconosciute.

Un'eccezione alla scarsa capacità di differenziamento delle linee cellulari EC sono proprio le TERA2. Queste cellule una volta trapiantate in topi *nude* producono tumori contenenti cellule EC, strutture ghiandolari simili ad un intestino primordiale con espressione della fosfatasi alcalina intestinale ALP, muscolo liscio ed elementi neuronali. In cultura il differenziamento è invece ottenuto grazie alla somministrazione di Acido Retinico (RA); si formano diversi tipi cellulari differenziati alcuni dei quali sono neuroni (Andrews et al, 1984; Andrews, 1984, 2002).

Il gruppo di Andrews ottenne dal tumore formato dalle cellule TERA2 nei topi *nude*, la linea NTERA2 dalla quale poi isolò diversi cloni a singola cellula. Uno di questi cloni sono proprio le NTERA2 clone D1 (NT2/D1) utilizzate in questo lavoro di tesi (Andrews et al, 1984).

2.3.1. Differenziamento delle NT2/D1

Le NT2/D1 mostrano una piccola evidenza di differenziamento spontaneo in cultura (Andrews et al, 1984; Andrews, 1984). Questo può essere indotto invece dalla crescita in presenza di Acido Retinico, analogo della vitamina A, ma anche da altri agenti come l'esametilene bisacetamide (HMBA: *hexamethylenebisacetamide*). Quando le NT2/D1 sono piastrate con RA tra il 10^{-5} M ed il 10^{-6} M la morfologia delle cellule cambia, rallenta la crescita e nell'arco di tempo di 7-10 giorni non si riscontrano più in cultura *EC-like cells*. A partire da questo momento si iniziano a osservare cellule con morfologia neuronale che esprimono i polipeptidi dei neurofilamenti (Andrews et al, 1984; Andrews, 1984). Quando le NT2/D1 vengono differenziate invece con HMBA 1-5 mM, le cellule presentano una variazione morfologica ed antigeni di superficie differenti da quelli

indotti dall'Acido Retinoico; in questo caso sono pochi i neuroni individuati in cultura (Andrews et al, 1986).

Il differenziamento indotto da RA è caratterizzato dal cambiamento nell'espressione dei glicolipidi da quelli della globoserie a quelli della lactoserie e ganglioserie che determina quindi la perdita di antigeni come SSEA3 ed SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81 e l'acquisizione di antigeni come SSEA1, A2B5 (ganglioside GT3) e ME311 (ganglioside 9-O-acetil GD3). Vi sono inoltre sostanziali cambiamenti nell'attività genica come l'attivazione dei geni HOX (Simeone et al, 1990), in una maniera dipendente dalla concentrazione dell'Acido Retinoico, e la comparsa di suscettibilità all'infezione e replicazione del citomegalovirus (Gönczöl et al, 1984) e del virus della immunodeficienza umana (Hirka et al, 1991).

L'uscita dei progenitori dal ciclo cellulare determina l'attivazione dei geni dei fattori di trascrizione neuronali bHLH (*basic helix loop helix*). Questi fattori di trascrizione sono espressi in maniera sequenziale durante lo sviluppo del sistema nervoso ed hanno la capacità di iniziare e sostenere una normale neurogenesi; essi includono Hes1 (*Hairy/enhancer of Split 1*), Ngn1 (*neurogenin 1*), Mash1 (*mammalian homologue of Drosophila achaete-scute gene*), NeuroD (*neural differentiation*), Math1 (*mammalian homologue of Drosophila atonal gene*), Pax6 (*Paired box*) (Gowan et al, 2001; Götz et al, 1998; Ross et al, 2003). L'espressione di questi bHLH risulta essere modulata durante il differenziamento delle NT2 in presenza di Acido Retinoico (Megiorni et al, 2005) in accordo alle cascate coinvolte nello sviluppo delle linee neuronali (Ross et al, 2003). È stato infatti osservato un aumento nella espressione di Ngn1 e Mash1, geni proneurali, alla quale seguiva l'attivazione trascrizionale di NeuroD e l'up regolazione di Math1 nei neuroni terminalmente differenziati (Megiorni et al, 2005). L'espressione di questi fattori durante il differenziamento RA-indotto dimostra che queste cellule sono capaci di dare origine ad un pool di sottotipi neuronali differenti. Studi effettuati su precursori neuronali di topo hanno dimostrato che Mash1 porta alla formazione di neuroni noradrenergici, GABAergici, e colinergici (Stanke et al, 2004) mentre Ngn1 e NeuroD danno origine ai neuroni glutamatergici e sensori (Ma et al, 1998; Sommer et al, 1996).

I neuroni glutamatergici possiedono sulla loro membrana i recettori del glutammato (GluRs); questi sono una famiglia di proteine transmembrana che media la maggior parte

della trasmissione neuronale di tipo eccitatorio nel sistema nervoso centrale dei mammiferi. Esse partecipano anche ai cambiamenti nella plasticità sinaptica, soprattutto nel corso del differenziamento del sistema nervoso centrale in particolare durante la formazione delle reti neuronali (Mayer and Westbrook, 1987; Dingledine et al, 1988; Monaghan et al, 1989). I GluRs sono distinti in due principali classi: ionotropici e metabotropici (Seeburg, 1993; Hollmann and Heinemann, 1994). I recettori ionotropici (iGluRs) contengono specifici canali ionici e sono suddivisi in tre sottogruppi: AMPA (dal nome dell'agonista, *amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate*), KAINATO e NMDA (dal nome dell'agonista, *N-methyl- D-aspartate*). I recettori metabotropici (mGluRs) sono accoppiati a *GTP-binding proteins (G-proteins)* e modulano la produzione di secondi messaggeri intracellulari.

I recettori NMDA mediano la neurotrasmissione eccitatoria del sistema nervoso centrale in modo diverso dai recettori non NMDA. Essi sono caratterizzati da un blocco voltaggio dipendente ad opera del Mg^{2+} (Mayer et al, 1984; Nowak et al, 1984), una lenta cinetica del canale ionico ed una notevole permeabilità al Ca^{2+} (MacDermott et al, 1986; Mayer and Westbrook, 1987; Lester et al, 1990). Le subunità del recettore NMDA sono la principale NR1 e la secondaria NR2 (A,B,C e D). Queste possono formare complessi sia omomerici che eteromerici, tuttavia l'ampiezza della risposta ottenuta con i complessi omomerici è molto più piccola rispetto a quella ottenuta con i complessi eteromerici. Studi molecolari hanno evidenziato che solo la subunità NR1 è in grado di formare strutture omomeriche funzionanti e che le altre sub unità, la cui espressione è regolata durante il differenziamento, hanno il ruolo di aumentare l'efficienza della risposta del recettore (Nakanishi, 1992; Seeburg, 1993; Mori and Mishina, 1995).

Le prime fasi del differenziamento neuronale sono caratterizzate dalla perdita dell'espressione della nestina, un tipico marcatore neuro ectodermico. La nestina appartiene alla VI classe di filamenti intermedi. Per quanto riguarda la struttura esonica ed intronica i geni della nestina sono identici in topo, ratto e uomo. Analisi di omologia di sequenza suggeriscono che il gene della nestina ed i geni dei NF (H,M,L) derivino da un precursore comune per duplicazione genica. A causa della estremità N terminale corta, la nestina non può formare omodimeri ma solamente eterodimeri in particolar modo con proteine della III classe di IF (Gilyarov, 2008). Molti autori considerano la nestina un

marker delle cellule staminali/precursori neuronali in quanto è stata rilevata nelle fasi precoci dello sviluppo embrionale del sistema nervoso in diversi tipi cellulari (Dahlstrand et al, 1995), come le cellule della glia, della zona ventricolare, nei precursori comuni (neuronali e gliali) (Hockfield and McKay, 1985) e nelle cellule neuroepiteliali (Taylor et al, 2001). La transizione dalla proliferazione allo stato post-mitotico (G_0) è accompagnato dalla rapida diminuzione della quantità dell'mRNA della nestina (Dahlstrand et al, 1995). Con l'avanzare del differenziamento del tessuto nervoso la sintesi della nestina diminuisce (Lothian and Lendahl, 1997) e la proteina acida fibrillare della glia e le proteine dei neurofilamenti iniziano ad essere espresse negli astrociti e nei neuroni rispettivamente. La diminuzione dell'espressione della nestina continua anche per il periodo post-natale e nell'animale adulto non è più individuata se non in aree come la zona sub ventricolare (SVZ: subventricular zone) (Ernst and Christie, 2005), i ventricoli laterali, il giro dentato dell'ippocampo (DG) (Cameron and McKay, 2001) che sono le zone germinative del cervello.

Per quanto riguarda le altre proteine che costituiscono il citoscheletro le NT2 esprimono, oltre alla ben conosciuta tripletta NF, soprattutto nelle forme L e M ed in maniera meno rilevante NF-H, la proteina NF da 66KDa, conosciuta anche come α -internessina, presente nel sistema nervoso centrale.

Le NT2 esprimono diverse proteine della famiglia MAPs (*microtubule associated proteins*). A questa famiglia è generalmente attribuita la funzione di stabilizzazione dei microtubuli. Evidenze accumulate suggeriscono invece che queste proteine siano inoltre in grado di legare i filamenti di actina, reclutare proteine del segnale e regolare il trasporto mediato dai microtubuli (Dehmelt and Halpain, 2005).

Durante il differenziamento indotto da Acido Retinoico, nella linea NTERA2 sono stati rilevati diversi membri della famiglia MAPs tra cui MAP1A-B, MAP2 e tau. Mentre MAP1A, al pari di NF-H, è espresso a bassi livelli durante lo sviluppo, risulta invece essere *up* regolato nel sistema nervoso adulto, compreso quello dell'uomo. Al contrario la proteina MAP1B è una forma embrionale e persiste durante la maturità ma a livelli ben inferiori.

L'espressione delle proteine MAP2 è anche essa regolata durante lo sviluppo. Le forme MAP2a e d sono presenti negli stadi adulti mentre MAP2b e c sono espresse negli stadi

fetale e post natale. Si ipotizza che la forma di MAP2 rilevata nelle NT2 sia l'embrionale MAP2b.

Tau viene espressa nelle NT2 nelle isoforme fetali a basso peso molecolare. Nell'uomo sono presenti sei isoforme di tau; queste sono prodotte da un singolo gene attraverso splicing alternativo. Le isoforme a basso peso molecolare hanno tre siti di legame dei microtubuli e sono espresse durante le prime fasi dello sviluppo embrionale mentre le isoforme con quattro ripetizioni sono espresse nella vita adulta (Kosik et al, 1989). Durante il differenziamento neuronale poi tau si concentra a livello degli assoni nascenti e MAP2 nei dendriti. Questi dati fanno dedurre che il citoscheletro delle NT2 sia simile a quello dei neuroni del CNS embrionale (Pleasure et al, 1992).

2.3.2. Protocolli di differenziamento: metodo per colture primarie di neuroni e metodo di aggregazione cellulare

In tutti gli studi effettuati durante gli anni '80 la percentuale di neuroni ottenuti dopo trattamento delle NT2 con Acido Retinoico era basso (5%) e in coltura erano soprattutto presenti cellule appiattite, residui delle cellule staminali indifferenziate (Andrews et al, 1984; Andrews, 1984).

L'utilizzo del differenziante chimico unito alla tecnica delle colture primarie permise all'inizio degli anni '90 di ottenere colture pure di neuroni. Il protocollo consisteva nel trattare le NT2 aderenti, in proliferazione, con RA per quattro settimane e di ripiastrarle per due volte su petri con matrice di poly-D-Lisina e laminina murina in un terreno contenente inibitori di mitosi per ulteriori due settimane. Questo trattamento permetteva di arricchire la cultura di neuroni fino al 95% ottenendo quindi cellule postmitotiche, con un fenotipo polarizzato stabile, che mantenevano però la plasticità dei neuroni immaturi in quanto rigenerano i neuriti dopo piastramenti multipli (Pleasure et al, 1992).

Alla fine degli anni '90 Chung e colleghi svilupparono invece un metodo per ottenere cellule differenziate in una maniera più rapida (Cheung et al, 1999). Questa tecnica si avvaleva della aggregazione cellulare, una condizione di crescita che probabilmente promuove la neurogenesi favorendo il contatto cellula-cellula e creando strutture che assomigliano al tessuto in vivo (Layer et al, 2002). L'importanza dell'aggregazione

nell'iniziare il differenziamento neuronale è stato riportato in diversi tipi cellulari come le staminali embrionali e le cellule EC della linea murina P19 (Larue et al, 1996; Smith et al, 1987).

Negli studi di aggregazione cellulare le NT2 venivano piastrate su petri per coltura batterica, che non favoriscono l'adesione, e poste in presenza di Acido Retinoico 10 μ M. Dopo un trattamento di 14 giorni le cellule venivano trasferite in petri con matrice di poly-D-Lisina, laminina murina e gelatina e incubate con AraC (citosina- β -D-arabinofuranoside) e uridina per altri sette giorni. I neuroni ottenuti potevano essere mantenuti in cultura per più di 3 settimane.

Sebbene questa tecnica permetta di ottenere neuroni in un tempo inferiore a quelli offerti dalle classiche metodologie di crescita in monostrato e nonostante permetta di differenziare le cellule a concentrazioni inferiori di RA, l'aggregazione di per se non può sostituire l'Acido Retinoico nel dare inizio ai processi biochimici coinvolti nel processo di differenziamento neuronale (Cheung et al, 1999).

2.3.3. Applicazioni della linea NT2

I neuroni ottenuti dalla linea NT2 sono stati utilizzati in maniera approfondita negli studi finalizzati alla comprensione dei meccanismi responsabili dell'insorgenza di malattie neurodegenerative (Cheung et al, 1999). A tutt'oggi queste cellule costituiscono comunque un valido modello *in vitro* per lo studio a livello molecolare delle fasi precoci del differenziamento neuronale (Megjorni et al, 2005) e proprio in quest'ottica sono state utilizzate in questo lavoro di tesi dato che sono molto simili alle cellule staminali embrionali.

Attualmente questa linea viene anche utilizzata per la terapia cellulare, considerata una delle strategie di trattamento più promettenti per diverse malattie neurodegenerative. Nel ventennio passato la principale fonte di cellule per il trattamento di Parkinson e Alzheimer è stato il tessuto fetale umano ma il suo utilizzo ha avuto diversi e ovvi fattori limitanti. Principalmente si tratta di questioni etiche trattandosi di feti abortiti; inoltre la resa in cellule era bassa, come la loro percentuale di sopravvivenza una volta trapiantate. Inoltre recentemente i trial clinici hanno dato risultati negativi (Freed et al, 2001; Newman et al, 2003). Le limitazioni sull'uso del tessuto fetale e le restrizioni poste sull'utilizzo delle

cellule staminali embrionali umane hanno dirottato l'attenzione su differenti tipi cellulari, le cellule del midollo spinale (Sanchez-Ramos et al, 2000; Sanchez-Ramos, 2002), del cordone ombelicale (Newman et al, 2004; Erices et al, 2003), del sangue periferico dell'adulto (Willing et al, 2003), i neuroni NT2 (Fricker-Gates et al, 2004) e queste cellule sono attualmente oggetto di studio per il trattamento di danni e malattie del sistema nervoso centrale.

Come abbiamo precedentemente spiegato le NT2 sono un sottoclone di una linea di teratocarcinoma umano che viene differenziato in cellule simil neuronali in seguito all'esposizione all'Acido Retinoico. Negli ultimi dieci anni i protocolli per il differenziamento sono stati sviluppati ed ora è possibile ottenere un numero elevato di neuroni NT2 (Cheung et al, 1999). La comunità scientifica ha però espresso preoccupazioni riguardanti l'utilizzo di queste cellule in terapia cellulare in quanto la loro origine è tumorale e quindi, anche se differenziate, potrebbero ritornare, dopo il trapianto, allo stato iniziale di cellula maligna (Newman et al, 2004).

Gli studi effettuati da Trojanoswski et al. (1993) su ratti neonati e adulti mostrano una ridotta sopravvivenza dei neuroni NT2 trapiantate nel neocortex o ippocampo; in un esperimento della durata di 21 settimane, la sopravvivenza era di 4 settimane per i neonati, 8 per gli adulti non immunosoppressi e 12 per quelli trattati con ciclosporina A. I neuroni NT2, anche se non raggiungevano la maturità, non formavano però neoplasie. Kleppner (1995) mostrò invece che neuroni trapiantati in topi neonati e adulti atimici potevano sopravvivere per più di 1 anno e che dopo 3-4 mesi le NT2-N avevano un fenotipo completamente differenziato, assenza di attività mitotica e di reversione alla loro origine tumorale. Inoltre una volta trapiantate nella materia grigia e bianca del midollo spinale di topi atimici sono in grado di rispondere ai diversi *microenvironment* dell'ospite e che questi ne specificano le caratteristiche (Hartley et al, 1999).

I modelli animali sono stati anche utilizzati per studiare l'impiego dei neuroni NT2 nella cura da danni ischemici, TBI (*traumatic brain injury*) (Philips et al, 1999) e malattie neurodegenerative come il Parkinson (Baker et al, 2000) e l'Huntington (Dunnett et al, 1997). I risultati mostrano una buona sopravvivenza delle cellule del trapianto, significativo recupero comportamentale e nessun effetto negativo.

I primi trial clinici sull'uomo sono stati effettuati nell'Università di Pittsburgh *Medical Center and Layton BioScience, Inc* per il trattamento dell'ictus cerebrale. I 12 pazienti trattati hanno mostrato miglioramenti a livello motorio senza mostrare però diminuzione dell'area infartuata a distanza di 24 settimane dal trapianto. Dati molto interessanti sono emersi dalla analisi del cervello di un paziente deceduto 27 mesi dopo l'operazione per cause non correlate all'ictus. I neuroni NT2 trapiantati sono stati identificati con la FISH (*fluorescent in situ hybridization*) e hanno mostrato immunoreattività per i Neurofilamenti, indice di maturità della cellula nervosa, ed inoltre non è stata osservata la presenza di neoplasie (Nelson et al, 2002).

Più recentemente Kondziolka e colleghi hanno riportato i dati di un secondo trial clinico su 14 pazienti usando neuroni NT2 per curare l'ictus. Alcuni pazienti hanno mostrato miglioramento dell'attività motoria e della memoria e non è stato riportato nessun effetto negativo (Stilley et al, 2004).

Per concludere anche se i neuroni NT2 vengono visti dalla comunità scientifica ancora in maniera diffidente, i dati ottenuti dai test di laboratorio e dai primi trial clinici dimostrano che queste cellule sono sicure anche a distanza di tempo dal trapianto, almeno un anno negli animali e 8 anni in pazienti con ictus, e che non formano neoplasie.

3. Campi magnetici e sistemi biologici

3.1. La vita e l'elettromagnetismo

Gli organismi viventi sono sistemi elettrochimici complessi che si sono evoluti in un mondo che li ha sottoposti a molteplici stimoli chimici e fisici diversi. Le leggi chimico-fisiche che regolano il comportamento delle macromolecole organiche e biologiche sono ovviamente le stesse che regolano l'intero universo conosciuto. Come sappiamo, una delle caratteristiche fondamentali della vita è quella di interagire con l'ambiente che la circonda e di adattarsi ai diversi segnali che riceve da esso, e soprattutto alle loro variazioni.

Una delle proprietà più evidenti del nostro mondo è quella di essersi evoluto sotto l'influenza dei campi magnetici naturali. L'esempio più rappresentativo di adattamento degli esseri viventi alla componente elettromagnetica dell'ambiente è il sistema visivo: l'occhio non è altro che un complesso dispositivo biologico deputato alla percezione dell'intervallo visivo dello spettro elettromagnetico. Nell'ultimo secolo però l'emissione dei campi magnetici è notevolmente aumentata a seguito dei radicali avanzamenti tecnologici a cui è andato incontro l'uomo contemporaneo (Frey, 1993).

Le interazioni magnetiche sono utilizzate da una grande varietà di organismi viventi, compreso l'uomo, per regolare funzioni cellulari critiche, dai ritmi circadiani, al sistema di navigazione degli uccelli, alle funzioni di membrana dei neuroni. Questo non ci sorprende perché le macromolecole biologiche sono sottoposte a forti condizionamenti magnetici: le molecole fondamentali della vita, le proteine, devono la loro conformazione, il loro *fold*ing, e quindi la loro funzione, a specifiche e precise forze magnetiche interne, così come anche le loro interazioni inter-molecolari dipendono dallo stesso tipo di forze.

Ciò premesso, non appare così sorprendente che molteplici frequenze, modulazioni ed intensità delle onde magnetiche vengano "percepiti" dagli organismi viventi, a partire dalle cellule, e di conseguenza provochino delle risposte e degli effetti biologici. Questa visione degli esseri viventi offre una prospettiva completamente diversa da cui analizzare i sistemi biologici, che permette di integrare le interpretazioni basate sulla biologia molecolare e la biochimica. La differenza fondamentale tra l'approccio molecolare e quello magnetico alla

fisiologia è che per quest'ultimo non è stata ancora formulata una teoria unitaria per spiegarne gli effetti e le interazioni (Liboff, 2004).

Per quanto certi approcci che utilizzano i campi elettrici e magnetici siano impiegati in clinica con buoni risultati, ad esempio la magnetoterapia in traumatologia e ortopedia (Marchetti et al, 1988; Betti et al, 1997) e le stimolazioni magnetiche transcraniali per il trattamento della depressione (Fujita and Koga, 2005), resta il problema della mancanza di conoscenze precise che guidino la scelta di un certo irraggiamento piuttosto che un altro per interagire con uno specifico meccanismo biologico.

Gli effetti indotti dalla stimolazione magnetica vengono valutati per le densità delle correnti prodotte. Mentre possono essere più chiari gli effetti causati da stimolazioni massicce, o comunque di media intensità (quale può essere quella di un *pace-maker* cardiaco), diventano difficilmente spiegabili i meccanismi che permettono ad una singola cellula di reagire a segnali di intensità tali, da non poter essere accoppiati in linea teorica a nessun evento fisiologico. Inoltre sarebbe importante valutare questi effetti anche in termini meramente fisici, oltre che a trovare spiegazioni che li leghino ad alterazioni dei “normali” meccanismi biochimici (Liboff, 2004).

3.2. Campi elettrici, campi magnetici, campi elettromagnetici: caratteristiche generali

I termini campo elettrico, campo magnetico, campo elettromagnetico, onda elettromagnetica non sono sinonimi, ma rappresentano fenomeni diversi, che hanno diverse modalità di interazione con i recettori biologici (Lozito, 2002).

Il *campo elettrico* è la grandezza fisica che caratterizza una regione di spazio le cui proprietà dipendono dalla distribuzione delle cariche elettriche. In particolare, le caratteristiche di un campo elettrico possono essere sintetizzate come segue:

- si manifesta con una forza che agisce su qualunque carica elettrica introdotta nello spazio sede di campo elettrico;
- è descritto mediante un vettore E (detto vettore campo elettrico, o semplicemente campo elettrico) che in ogni punto della regione di spazio indica la direzione,

l'intensità ed il verso della forza che agisce su una carica puntiforme unitaria posta in quel punto;

- la sua intensità si misura in volt al metro (V/m);
- a causa della forza che esercita sulle cariche, il campo elettrico è in grado di generare correnti elettriche nei materiali cosiddetti conduttori.

Il *campo magnetico* è la grandezza fisica che caratterizza una regione di spazio le cui proprietà dipendono dalle distribuzioni delle correnti elettriche. In particolare, le caratteristiche di un campo magnetico possono essere sintetizzate come segue:

- si manifesta con una forza che agisce su qualunque altra corrente elettrica o carica elettrica non in quiete introdotta nello spazio sede di campo magnetico;
- può essere descritto mediante un vettore H (detto densità di flusso magnetico, o anche induzione magnetica) definito dalla forza che in ogni punto della regione di spazio si manifesta su una corrente o una carica elettrica elementare non in quiete, posta in quel punto;
- la sua intensità si misura in tesla (T).

Gli effetti dell'interazione di una particella carica con un campo magnetico sono descritti dalla forza di Lorentz. Tale forza è originata dal campo magnetico, e agisce su una particella di carica q che entra con velocità v in un campo magnetico B , ed è rappresentata dal prodotto vettoriale:

$$\mathbf{F} = q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$$

Se il vettore v è parallelo al vettore del campo magnetico B , allora il modulo della forza è uguale a zero e sulla particella carica non agisce nessuna forza che perturbi il suo moto. Se invece una carica entra con una velocità perpendicolare al campo, questa si muoverà di moto circolare uniforme. Infine se il vettore velocità è obliquo rispetto al vettore campo magnetico risulterà un moto a spirale o elicoidale della particella (Serway, 1998).

Carica elettrica e corrente elettrica (Fig. 3) sono quindi, come precedentemente detto, le sorgenti materiali rispettivamente del campo elettrico e del campo magnetico.

Un campo elettrico può essere generato, oltre che da una distribuzione di carica elettrica, anche da un campo magnetico variabile nel tempo. Allo stesso modo, un campo magnetico

può essere generato, oltre che da una distribuzione di corrente elettrica, anche da un campo elettrico variabile nel tempo. Quindi, in regime variabile nel tempo, campo elettrico e campo magnetico diventano uno la sorgente (cioè la "causa") dell'altro: in queste condizioni, campo elettrico ed campo magnetico possono essere considerati come due aspetti di un'unica grandezza fisica, il *campo elettromagnetico*, in grado di propagarsi a distanza indefinita dalla sorgente (Lozito, 2002).

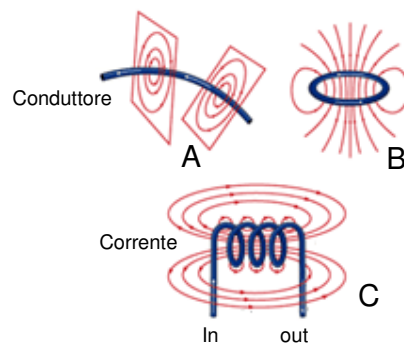


Fig. 3. Rappresentazione delle linee di forza (rosso) di un campo magnetico generato da diversi avvolgimenti di filo percorso da corrente: filo singolo (A), spira (B), solenoide (C).

In particolari condizioni spaziali, di geometria delle sorgenti e di lunghezze d'onda, l'ampiezza del campo elettromagnetico varia in modo oscillatorio sinusoidale sia nel tempo che nello spazio. In queste condizioni, la radiazione elettromagnetica è rappresentata da un'onda elettromagnetica.

La struttura spaziale del campo in funzione della distanza mostra che in prossimità della sorgente (es. antenna, apparato industriale a radiofrequenza, elettrodotto, elettrodomestico) prevalgono il campo elettrico ed il campo magnetico (*campo vicino*), sono cioè indipendenti l'uno dall'altro, mentre per distanze superiori a circa una lunghezza d'onda diviene prevalente il campo elettromagnetico. La struttura dei campi assume, in questo caso, le caratteristiche della radiazione, cioè la mutua generazione tra campo elettrico e campo magnetico. Si parla quindi di condizioni di *campo lontano* quando i due campi

sono in fase, ortogonali tra loro e trasversali rispetto alla direzione di propagazione (Fig.4) (Lozito, 2002).

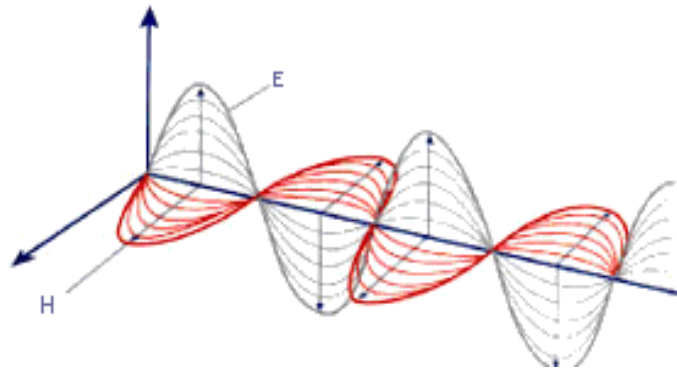


Fig.4. Il campo elettrico (E) ed il campo magnetico (H) si propagano perpendicolarmente tra loro e rispetto alla direzione dell'onda.

In molti casi le ampiezze dei campi radiativi variano in modo sinusoidale tanto nel tempo quanto nello spazio. Si parla allora, come già accennato prima, di onda elettromagnetica, che ha la proprietà di propagarsi a grande distanza dalla sorgente dalla quale è stata generata (antenna) ed in cui i campi, elettrico e magnetico, sono perpendicolari tra di loro e alla direzione di propagazione dell'onda (Fig.4).

Per riassumere, nell'onda elettromagnetica il campo elettrico (E) e quello magnetico (H) sono inscindibili l'uno dall'altro e l'esistenza dell'uno comporta sempre l'esistenza dell'altro.

La variabilità nel tempo viene descritta dalla frequenza, che è uguale al numero di oscillazioni del campo nell'unità di tempo, e si misura in *Hertz* (Hz). La frequenza f è legata alla lunghezza d'onda λ dall'equazione:

$$v = f\lambda$$

dove v è la velocità di propagazione dell'onda, quindi la frequenza e la lunghezza d'onda sono inversamente proporzionali (Serway, 1998). Viene chiamato spettro del campo elettromagnetico l'insieme continuo delle sue frequenze (Fig. 5).

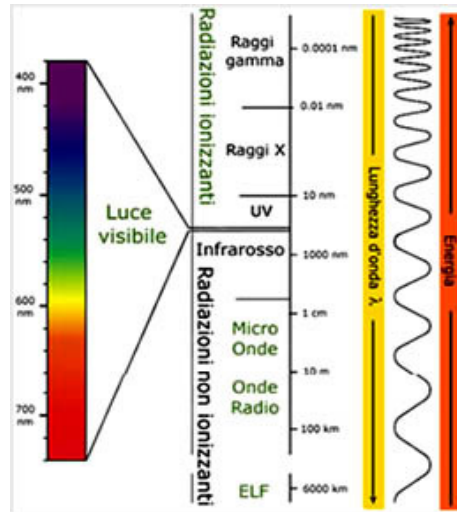


Fig. 5. Spettro del Campo Elettromagnetico.

3.3. Elettricità e magnetismo: sorgenti artificiali di origine antropica

Tutte le tecnologie, che per il loro funzionamento usano energia elettrica, generano campi elettrici, campi magnetici, o campi elettromagnetici. Deve essere però precisato che per alcune tecnologie la generazione dei campi elettromagnetici durante il loro funzionamento costituisce un effetto non voluto, né necessario per il funzionamento stesso (Lozito, 2002). Ad esempio, lo scopo di un elettrodotto non è quello di generare campi elettrici e magnetici, ma quello di trasportare e distribuire energia elettrica, per cui si può affermare che il campo elettrico e magnetico sono effetti secondari non necessari al funzionamento dell'elettrodotto. Tale situazione è però specifica solo per pochissime tecnologie, in quanto generalmente la produzione di campi elettromagnetici non rappresenta un effetto secondario, ma è lo scopo principale per il quale sono progettate le tecnologie elettriche ed elettroniche. Ciò è tipico dei sistemi di telecomunicazione, nei quali l'informazione, per essere trasmessa a distanza, deve necessariamente essere supportata da una emissione di campo elettromagnetico.

Le radiazioni non ionizzanti, dette anche **N I R** (*Non Ionizing Radiation*), (Tabella 2) hanno frequenza compresa tra 0 Hertz (Hz) e 3×10^{11} Hertz (300 GHz) e possono a loro volta essere suddivise in:

- campi magnetici a frequenze estremamente basse (**ELF**: *extremely low frequency*);
- radiofrequenze (**RF**);
- microonde (**MO**).

<u>DENOMINAZIONE</u>		<u>SIGLA</u>	<u>FREQUENZA</u>	<u>LUNGHEZZA D'ONDA (λ)</u>
FREQUENZE ESTREMAMENTE BASSE		ELF	0 – 3 kHz	> 100 Km
FREQUENZE BASSISSIME		VLF	3 – 30 kHz	100 – 10 Km
RADIOFREQUENZE	BASSE FREQUENZE (ONDE LUNGHE)	LF	30 – 300 kHz	10 – 1 Km
	MEDIE FREQUENZE (ONDE MEDIE)	MF	300 kHz – 3 MHz	1 Km – 100 m
	ALTE FREQUENZE	HF	3 – 30 MHz	100 – 10 m
	FREQUENZE ALTISSIME (ONDE METRICHE)	VHF	30 – 300 MHz	10 – 1 m
MICROONDE	ONDE DECIMETRICHE	UHF	300 MHz – 3 GHz	1 m – 10 cm
	ONDE CENTIMETRICHE	SHF	3 – 30 GHz	10 – 1 cm
	ONDE MILLIMETRICHE	EHF	30 – 300 GHz	1 cm – 1 mm

Tabella 2. Radiazioni non ionizzanti (NIR)

Nell'intervallo compreso tra 0 e 3000 Hz abbiamo le radiazioni a frequenza estremamente bassa (*Extremely Low Frequency*, ELF) le quali hanno una lunghezza d'onda maggiore di 100 Km. Questo tipo di onde vengono generate da elettrodotti a bassa, media, alta tensione, da linee elettriche di distribuzione e tutti i dispositivi alimentati a corrente elettrica alla frequenza di 50 Hz, ad esempio elettrodomestici, videoterminali. A queste frequenze molto basse il campo generato è in realtà molto simile alla somma di due campi statici, uno elettrico e l'altro magnetico, piuttosto che ad un vero campo elettromagnetico (Lozito, 2002).

3.4. L'interazione per risonanza

Fin dagli anni '70, sono stati ottenuti dati sperimentali che evidenziavano in risposta all'applicazione di campi elettromagnetici, di opportuna intensità e frequenza, un effetto biologico massimo a specifiche frequenze di stimolazione; questo suggeriva l'intervento di un fenomeno nuovo detto di risonanza (Liboff, 2004). Un modello appropriato per prevedere come gli organismi viventi rispondano ai campi magnetici sarebbe quello di paragonarli ad un ricevitore radio. Infatti una radio è immersa in un ambiente ricchissimo di segnali ed onde, ma essa non li riceve tutti, perché non sono alla frequenza o alla modulazione appropriate. Ma se esponiamo la radio ad un segnale appropriatamente sintonizzato, questo interferirà con l'apparecchio, anche se è d'intensità molto bassa, e da esso sarà amplificato. Allo stesso modo, se esponiamo un sistema vivente ad una segnale elettromagnetico molto debole, ma opportunamente sintonizzato, questo potrebbe interagire in risonanza con una normale funzione biologica che sviluppa deboli correnti alternate endogene a quella stessa frequenza (Frey, 1993; Liboff, 2004). Questo tipo di interazione in risonanza è stato osservata in molti sistemi non viventi, suggerendo che deboli campi magnetici possano causare un effetto di risonanza a livello molecolare e sopra-molecolare nelle soluzioni di elettroliti, e pertanto possono influenzare in tal modo i processi biologici (Pazur, 2004).

Un modello basato sul fenomeno della risonanza è stato proposto da Liboff nel 1985. Liboff, per spiegare questo aspetto dell'interazione tra campi magnetici a bassa frequenza ed i sistemi biologici, ha suggerito che il sito cellulare di interazione potessero essere i

canali ionici di membrana, proprio in virtù delle loro caratteristiche elettriche. Infatti il trasporto ionico attraverso questi canali è governato non solo da sensori di voltaggio, ma anche da campi elettrici oscillatori, che risultano dalla distribuzione elicoidale degli ossigeni carbonilici che si trovano nelle pareti del canale sul lato luminale.

Liboff propose anche che i periodici cambiamenti nella concentrazione ionica associati all'oscillazione dello ione Ca^{2+} potrebbero risultare in variazioni nel campo elettrico intracellulare. Il fenomeno della risonanza avverrebbe quando la cellula viene esposta ad una specifica combinazione di campi magnetici statici deboli e alternati a bassa frequenza. Secondo Liboff, alla frequenza di risonanza il campo ELF ed il campo magnetico statico accelererebbero le molecole e gli ioni in un moto a spirale, per esempio all'interno di un canale di membrana, e questo potrebbe alterare la normale fisiologia elettrochimica della cellula. Tali fenomeni di risonanza potrebbero essere non soltanto la modalità con cui campi magnetici esterni possono interagire con i sistemi biologici, ma la modalità stessa con cui funzionano tanti meccanismi cellulari (Liboff, 1997).

3.5. Gli effetti dei campi ELF sulla cellula

L'effetto biologico dei campi elettromagnetici è stato oggetto di studio sin dall'inizio del diciannovesimo secolo e poi abbandonato a causa della complessità della materia. Negli anni '50 l'interesse riaffiorò e in paesi come l'ex-Unione Sovietica, gli USA, l'Italia e l'Inghilterra furono effettuati studi approfonditi principalmente riguardanti il possibile effetto nocivo dei campi generati dagli elettrodotti.

Sin ad oggi non c'è ancora nessun accordo generale sull'esatto effetto dei campi elettromagnetici sui sistemi biologici ed in particolare dei campi a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF). Gli effetti dell'esposizione sembrano dipendere da diversi fattori come le caratteristiche fisiche del segnale, i parametri di esposizione ed il tipo cellulare, di conseguenza i risultati provenienti dai laboratori di tutto il mondo non sono sempre coerenti gli uni con altri. I numerosi dati che sono stati ottenuti da modelli *in vitro*, sottoposti a diverse condizioni sperimentali, mostrano che i campi magnetici di moderata intensità sono capaci di influenzare diversi processi biologici che sono collegati alle proprietà dei canali di membrana (Liburdy, 1992; Adey et al, 1993; Blackman et al, 1994; Barnes, 1996;

Liboff, 2007). Questi effetti, inizialmente studiati da Liboff (1985a,b; 1987), Blackman (1985) e Lednev (1991), sono stati spiegati come un'alterazione nel flusso di calcio attraverso la membrana plasmatica.

I meccanismi cellulari che risultano essere influenzati dall'esposizione ai campi ELF-EMF sono numerosi e comprendono cambiamenti nella concentrazione di secondi messaggeri come l'inositolo 3 fosfato (IP3, *Inositol triphosphate*) (Korzh-Sleptsova et al, 1995), nell'omeostasi del calcio (Walleczeck, 1992; McCreary et al, 2006) variazioni dell'espressione genica, della proliferazione (Cosarizza et al, 1989; Cadossi et al, 1992; Manni et al, 2002), del differenziamento cellulare (Chang et al, 2004; Ventura et al, 2004; Manni et al, 2004) e dell'apoptosi (Nikolva et al, 2005).

I modelli cellulari utilizzati in laboratorio per studiare l'interazione tra il sistema biologico e i campi magnetici sono stati differenti. Tra questi possiamo citare le cellule del sistema immunitario come la linea linfoide umana (Santoro et al, 1997; Lisi et al, 2000), e la linea leucemica umana delle cellule T (Lindstrom et al, 1995) e cellule epiteliali come le linee umane di cheratinociti dell'epidermide e della mucosa orale (Manni et al, 2002; Manni et al, 2004), cellule della muscolatura scheletrica come la linea di mioblasti murini (dati in pubblicazione) dove si sono osservate, in seguito all'esposizione, modificazioni nella concentrazione di calcio intracellulare e della proliferazione cellulare, variazioni morfologiche accompagnate da riarrangiamento del citoscheletro ed espressione dei marcatori specifici del differenziamento.

Molto importanti sono inoltre i dati che abbiamo ottenuto nel nostro laboratorio i quali mostrano come i campi ELF-EMF siano in grado, senza l'utilizzo del differenziante chimico 5-azacitidina, di determinare lo specifico commitment delle cellule staminali cardiache umane ottenute da biopsie (Gaetani, Ledda et al, 2009).

Risultati interessanti sono stati inoltre raggiunti studiando i possibili effetti dell'esposizione agli ELF-EMF sulle cellule neuronali. I dati provano che l'esposizione sia in grado di stimolare il pathway che porta al differenziamento cellulare. Questo è stato mostrato nelle cellule cromaffini di ratto che differenziano in simil-neuroni simpatici in seguito alla esposizione al campo di 60 Hz, 0.7mT (Olivares-Banuelos et al, 2004) e nella linea PC12 (Blackman et al, 1995; Feria-Velasco et al, 1998; McFarlane et al, 2000). Ulteriori dati derivano da studi sui progenitori neuronali dove si è osservato un aumento

della neurogenesi con una upregolazione dell'attività dei canali Cav₁ (Piacentini et al, 2008), e nel nostro laboratorio, dove è stata mostrata una accelerazione nel differenziamento dei granuli cerebellari di ratto (Lisi et al, 2005).

Rimanendo in tale ambito, in questa tesi verranno mostrati i risultati ottenuti studiando l'interazione tra campi elettromagnetici ELF-EMF ed una linea di origini ipofisaria, modello di neuroni peptidergici, ed i dati preliminari sulla linea NT2 di teratocarcinoma umano.

MATERIALI E METODI

MATERIALI: AtT20

Linea cellulare

Le cellule della linea AtT20 clone D16V (ATCC[®] Number: **CRL-1795TM**, American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) derivano da un tumore murino della ghiandola pituitaria. Differenziano spontaneamente dopo 5 giorni dalla messa in cultura sviluppando processi neuritici con coni di crescita ed accumulando granuli secretori contenenti ACTH (ormone adreno corticotropo).

Terreno di crescita

DMEM (pbi International. Milano, Italy)

FCS (Fetal Calf Serum) 5% (Gibco BRL)

L-glutamina 4 mM (Biological Industries. Kibbutz Beit Haemek, ISRAEL)

Pen/strep solution 1%: penicillina [100U/ml]+ streptomicina [10mg/ml] (Biological Industries)

MATERIALI: NT2

Linea cellulare

Le NTera-2 cl.D1 [NT2/D1] (ATCC[®] Number: **CRL-1973TM**) sono una linea cellulare pluripotente di carcinoma embrionale del testicolo (teratocarcinoma) e sono un clone della

linea NTERA-2 (Andrews et al, 1984). La linea parentale NTERA-2 è stata ottenuta negli anni '80 dallo xenotrapianto di cellule Tera-2 in un topo *nude* (Andrews, 1988). Le NT2/D1 differenziano in coltura in presenza di Acido Retinoico in neuroni post mitotici e polarizzati.

Terreno di crescita

DMEM (pbi International. Milano, Italy)

FBS (Fetal Bovine Serum) 10% (Gibco BRL)

L-glutammina 4 mM (Biological Industries. Kibbutz Beit Haemek, ISRAEL)

Pen/strep solution 1%: penicillina [100U/ml]+ streptomicina [10mg/ml] (Biological Industries)

Terreno di differenziamento

DMEM (pbi International. Milano, Italy)

FBS (Fetal Bovine Serum) 10% (Gibco BRL)

L-glutammina 4 mM (Biological Industries. Kibbutz Beit Haemek, ISRAEL)

Pen/strep solution 1%: penicillina [100U/ml]+ streptomicina [10mg/ml] (Biological Industries)

Acido Retinoico 1 μ M in DMSO (Sigma. St. Louis, MO, USA)

TAMPONI E SOLUZIONI: AtT20

Analisi raziometrica del Calcio intracellulare e del pH

5 μ M indo-1/AM, (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)

5 μ M SNARF-1/AM, (Molecular Probes)

1.5% DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma)

0.04% Puronic F-127 (Molecular Probes)

in DMEM senza siero

SEM (Scanning Electron Microscopy)

Soluzione di lavaggio:

PBS 1X, pH 7.4 (pbi International)

Soluzione di fissaggio:

Glutaraldeide (2.5%) in soluzione tampone di Millonig 0.1 M

Soluzione di post-fissaggio:

1% OsO₄

Soluzione di deidratazione:

Acetone

TEM (Transmission Electron Microscopy)

Soluzione di lavaggio:

PBS 1X

Soluzione di fissaggio:

2.5% glutaraldeide in PBS 1X, pH 7.4

Disidratazione:

EtOH

Microscopia confocale

Soluzione di lavaggio:

PBS 1X, (pbi International)

Soluzione di fissaggio:

Paraformaldeide (4%) in PBS 1X

Soluzione di permeabilizzazione membrane:

Triton X-100 (0.1%) (Sigma)

BSA (1%) in PBS 1X

Soluzione anticorpi primari:

BSA (1%) in PBS 1X

Anticorpo I	Diluizione	Ditta
NF-H	1:1000	Sigma
Sinaptofisina	1:400	Sigma

Soluzione per marcatura dell'Actina citoscheletrica:

Phalloidin-FITC (Sigma) 10µg/ml in PBS 1X

Soluzione anticorpi secondari:

BSA (1%) in PBS 1X

Anticorpo II	Diluizione	Ditta
Anti Mouse, FITC	1:1000	Sigma

Soluzione Marcatore Nuclei:

Hoechst [bisBenzimide, 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrat] (Sigma)

diluizione 1:8000 in PBS 1X

TAMPONI E SOLUZIONI: NT2

Analisi della proliferazione cellulare: Ioduro di Propidio

Soluzione di lavaggio:

PBS/EDTA 0.2 %

Soluzione di fissaggio:

1:1 PBS/EDTA 0.2 %, Acetone Metanolo (1:5)

Soluzione di marcatura del DNA:

Ioduro di propidio (Sigma)

METODI: AtT20

Coltura

Le cellule della linea AtT20 sono state piastrate alla concentrazione di 250.000 cellule/ml e fatte crescere in monostrato su vetrini copri oggetto (spessore 00; Corning Glass Works, Corning, NY, USA) trattati con con Poly-L-lisina o in fiasche usando Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplementato con 5% siero fetale di vitello (fetal calf serum, FHS), 1.0mg/ml penicillina, 1.0mg/ml di streptomina (Sigma) a 37°C in un incubatore al 95% di umidità e 5% di CO₂.

Apparati di esposizione ai campi ELF-EMF

Dato un valore del campo magnetico statico esiste una finestra di frequenze di campo magnetico alternato che sono in grado di entrare in risonanza con lo ione calcio. Utilizzando una frequenza di 50Hz ci troviamo alle estremità di questa finestra di frequenze e al fine di trasferire sufficiente energia al sistema è stato necessario utilizzare una intensità di campo di 2mT.

Apparato di esposizione acuta per microscopia a epifluorescenza

Una spira MF, che consiste in due giri di filo di rame spesso 1.2 mm a formare un cerchio con raggio di 10mm, è stato inserito in una cameretta di incubazione tramite un *stereotactic controller* e sistemato in modo tale da essere concentrico al campo visivo. Dato che la sonda non era attaccata alla cameretta quest'ultima poteva essere spostata lungo l'asse delle x e delle y in modo da selezionare il campo di cellule da esaminare.

Per calibrare il campo MF, è stato determinato che la densità del flusso aumenta in prossimità del conduttore lungo il piano orizzontale. Il campo magnetico MF, misurato con una sonda di Hall ed uno oscilloscopio, mostra una diminuzione approssimativamente del 10% quando la sonda era spostata lateralmente entro i 3mm di raggio sul piano orizzontale. La variazione nel campo misurato era di -15% per 1mm di spostamento lungo l'asse x del microscopio. Il vetrino copri oggetto con le cellule era stato posizionato 2mm al di sotto del centro della spira. La presenza dell'obiettivo del microscopio non perturbava il campo magnetico. Per produrre un MF di 2mT è stato necessario erogare una corrente di 20A la quale è stata generata da un piccolo trasformatore *step-down* 50V/A (RS Electronics, Milano, Italia) collegato ad un regolatore di voltaggio manuale (RS Electronics). La temperatura è stata mantenuta a $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ per l'intera durata dell'esperimento. Il bagnetto è stato riscaldato per effetto *Peltier* e la T controllata con una sonda posta ad 1mm al di sopra delle cellule, 1mm al di sotto della spira e 1mm lateralmente rispetto al centro del campo visivo.

Apparato di esposizione continua al campo magnetico

Le cellule sono state esposte per 24-48 ore ad un campo magnetico sinusoidale di 50 Hz, ad una densità di flusso di 2 mT (rms), in un solenoide inserito all'interno di un incubatore per cellule appropriatamente ventilato e con atmosfera al 5% di CO₂. La temperatura è stata mantenuta ad un valore costante di 37±0.3°C, e continuamente controllata mediante un termometro Hanna HI 9274 OC. I campioni di controllo sono stati collocati in un secondo incubatore dello stesso tipo di quello contenente il solenoide e nelle stesse condizioni sperimentali di temperatura, umidità e CO₂. Tutti gli esperimenti sono stati condotti alla cieca.

Il solenoide utilizzato in questo lavoro di tesi è già stato ampiamente descritto in precedenti pubblicazioni (Santoro *et al*, 1997; Lisi *et al*, 2000; Manni *et al*, 2002; Manni *et al*, 2004; Lisi *et al*, 2005). Il corpo principale del solenoide consiste in un cilindro di asbesto spesso 2 cm, avente diametro di 20 cm ed un'altezza di 40 cm. E' costituito da 1200 spire di filo di rame di 2 mm di diametro avvolte intorno al cilindro di asbesto in tre strati, procedendo in continuità da un'estremità all'altra per tre volte avanti e indietro. L'intensità di campo di 50 Hz è generata da un autotrasformatore variabile generante un flusso di densità di 2 mT (rms) per un voltaggio applicato pari a 12 Volts (rms). Il solenoide, come precedentemente detto, è stato posto in un incubatore per cellule munito di un ventilatore per un'appropriata circolazione dell'aria. Il modesto riscaldamento dovuto all'effetto *Joule* è stato quindi efficientemente disperso grazie all'azione della continua ventilazione forzata nella massa totale dell'incubatore a CO₂. Poiché una lunga permanenza a temperature più alte di quella fisiologica induce in genere nei campioni esposti la sintesi delle proteine da stress termico denominate *Heat Shock Proteins* (HSP), è stata effettuato un *Western Blot* per la proteina da shock termico HSP-70 sia sulle cellule esposte che su quelle di controllo. Questo esperimento non ha mostrato differenze di espressione della HSP-70 nei due tipi di campioni, suggerendo che le cellule esposte non vanno incontro ad uno stress indotto da un aumento della temperatura (dati non mostrati). L'intensità del campo (B), misurata con una sonda Hall, rimaneva entro il 5% del valore centrale del volume cilindrico di esposizione, che era di 11 cm x 17 cm lungo l'asse del solenoide. Il campo geomagnetico ambientale

misurato era di 32 μT per la componente verticale e 16 μT per la componente orizzontale. I campi ambientali sporadici erano al di sotto di 0.1 μT

Analisi della concentrazione del Calcio intracellulare e del pH con sonde fluorescenti indo-1 e SNARF-1

Metodo raziometrico

Una importante tecnica che offre la possibilità di misurare accuratamente le concentrazioni di ioni intracellulari è data dal trattamento dei dati di fluorescenza come rapporti di intensità di fluorescenza a due lunghezze d'onda (λ) piuttosto che l'intensità assoluta ad una data lunghezza d'onda. Nel metodo raziometrico le variabili che possono perturbare il sistema vengono eliminate. In particolare i fattori ione-dipendente che influenzano l'intensità del segnale, come una concentrazione intracellulare non uniforme della sonda, la mancanza di sonda, il bleaching e lo spessore cellulare sono eliminati in quanto hanno lo stesso effetto sull'intensità a entrambe le λ .

I punti ai quali le intensità di assorbimento, eccitazione o emissione risultano essere indipendenti dalla concentrazione delle specie ioniche in esame sono chiamati punti isosbistici. La presenza di tale punto indica che la sonda esiste in due stati che mostrano un cambiamento nello spettro quando sono nella forma libera o legata.

Sonde

Le sonde scelte per la misura raziometrica del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e del pH_i sono indo-1/AM (Grynkiewicz et al, 1985) e SNARF-1/AM (Negulescu and Machen, 1990) rispettivamente.

Indo-1 è una sonda fluorescente per il calcio intracellulare. Prima dell'inizio dell'esperimento l'indicatore è stato calibrato con soluzioni a concentrazione nota di Ca^{2+} per ottenere il valore della costante di dissociazione della sonda. In figura 3A è riportato lo spettro d'emissione di indo-1 alla lunghezza d'onda di eccitazione di 338nm per soluzioni a concentrazione crescente di Ca^{2+} (0-39 μM). Usando il rapporto delle intensità di

fluorescenza prodotte dall'eccitazione o emissione a due lunghezze d'onda, si è potuto calcolare la $[Ca^{2+}]_i$ utilizzando la seguente equazione:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d Q (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

R rappresenta il rapporto dell'intensità di fluorescenza $F_{\lambda 1} / F_{\lambda 2}$ dove $\lambda 1$ (~405nm) e $\lambda 2$ (~485nm) sono le lunghezze d'onda rilevate per la sonda legata allo ione e per la sonda libera. I rapporti corrispondenti ai punti finali di titolazione sono denotati con la dicitura indicante il minimo (min) e massimo (max) della concentrazione del Ca^{2+} .

Q è il rapporto F_{min} su F_{max} a $\lambda 2$ (475).

K_d è la costante di dissociazione della sonda.

La calibrazione di indo 1 richiede che si effettuino misure completamente per l'indicatore saturo e libero dallo ione per determinare i valori di F_{min} , F_{max} , R_{min} , R_{max} e per l'indicatore in presenza di concentrazioni note di Ca^{2+} per determinare la K_d .

In questo set di esperimenti indo-1/AM è stata eccitata alla lunghezza d'onda di 350nm. Le intensità di emissione (Fig. 6.A) sono state registrate a 405 (per la sonda legata al calcio) e 475nm (per la sonda libera).

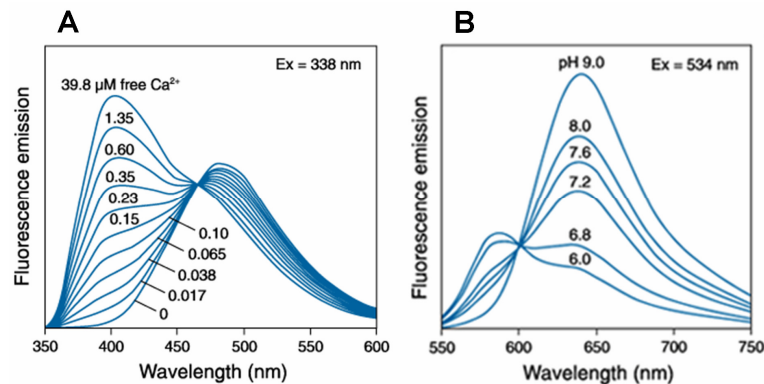


Fig. 6. Spettri di emissione delle sonde raziometriche per la $[Ca^{2+}]_i$, indo-1 (A) e pH_i , SNARF-1 (B) alle lunghezze d'onda d'eccitazione di 338 e 534nm rispettivamente.

SNARF-1 è un indicatore di $[H^+]$ il cui spettro di emissione va incontro ad uno *shift* pH-dipendente; questo permette di utilizzare il rapporto delle intensità di fluorescenza a due

lunghezze d'onda di emissione per determinare in maniera più accurata il pH. In figura 6.B è riportato lo spettro d'emissione di SNARF-1 alla lunghezza d'onda di eccitazione di 534nm per soluzioni a pH crescente (pH 6-9). In questo lavoro di tesi sono state utilizzate una lunghezza d'onda d'eccitazione a 540nm e monitorate le emissioni a 575 e 640nm.

Entrambe le sonde presentano un gruppo acetossimetil estere (AM) che rende la molecola neutra e capace di permeare la membrana cellulare. Una volta all'interno i gruppi lipofili vengono tagliati da esterasi non specifiche così formando una molecola carica che non può fuoriuscire.

Le apparecchiature e le metodologie per una rapida acquisizione in tempo reale delle immagini multiple in fluorescenza e l'analisi off-line dei dati sono state sviluppate da SJ Morris e S Grimaldi.

Marcatura cellulare con le sonde fluorescenti

La doppia marcatura con indo/SNARF per la misurazione simultanea del $[Ca^{2+}]_i/pH_i$ è stata effettuata come descritto da Wiegmann (1993). Le cellule AtT20 D16V sono state piastrate alla concentrazione di 250.000/ml su vetrini copri oggetto e incubate con 5 μ M indo-1/AM e 5 μ M SNARF-1/AM in 0.5ml di DMEM senza siero contenente 1.5% DMSO e 0.04% Pluronic F-127 per 30 minuti a 37°C, 5% di CO₂ in un incubatore umidificato. In seguito le cellule sono state incubate per 30 minuti in DMEM supplementato con 5% FCS ed utilizzate per le misurazioni entro due ore dalla marcatura. Questi esperimenti sono stati effettuati in triplicato per un totale di 500 cellule analizzate.

Misurazione della fluorescenza

I dati sono stati acquisiti con un microscopio invertito della Nikon equipaggiato con un obiettivo ad immersione (olio) Fluor 40X phase DL 1.30 e per la simultanea eccitazione a due ed emissione a quattro lunghezze d'onda (Nikon Instruments, Melville, NY, USA). Il microscopio non conteneva parti mobili come otturatori, monocromatori o ruote di filtri. La doppia eccitazione di epifluorescenza è stata generata da una lampada allo xenon a 75W con doppia porta che alloggiava due filtri a banda passante 350DF10 e 540DF10 (Croma Technology, Brattleboro, VT, USA) per l'eccitazione rispettivamente di indo-1 e SNAR-1.

Per effettuare la misura raziometrica sono state registrate le immagini di emissione a 405/475nm per indo-1 e a 575/640nm per SNARF-1. Le quattro lunghezze d'onda di emissione sono state registrate da telecamere CCD (KS-1381, Video Scope, Washington, DC; 1000 CCD, Dodge/MTI, Michigan City, IN, USA). Prima dell'inizio dell'esperimento sono state definite le regioni di interesse (ROI) per diverse cellule nel campo come descritto da Morris (1993; 1994) e l'intensità luminosa integrata ricavata e stata visualizzata sul display come rapporto 405/475nm e 575/640nm in tempo reale. Questi rapporti sono proporzionali al Ca^{2+} intracellulare e al pH. La registrazione è stata fatta iniziare quando i valori delle letture erano costanti. Il campo ELF-EMF è stato acceso dopo 300s e la registrazione fatta proseguire per almeno altri 300s.

Valutazione off-line dei dati e analisi statistica

I dati sono stati analizzati *off-line* a livello delle ROI nelle immagini registrate come descritto da Morris (1993; 1994). I valori del $[Ca^{2+}]_i$ sono stati corretti per la dipendenza della costante di dissociazione della sonda indo-1 (K_d) dal pH e rappresentati insieme ai dati del pH_i in un grafico in relazione al tempo grazie all'utilizzo di un software commerciale (Sigma Plot, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Tutti i dati sono stati analizzati con il test di t-Student con $P < 0.001$ come minimo livello di significatività.

SEM (Scanning Electron Microscopy)

Le cellule di controllo ed esposte agli ELF-EMF sono state lavate in PBS 1X e fissate in 2.5% Glutaraldeide in soluzione tampone di Millonig 0.1 M per 1 ora a 4°C. Dopo tre lavaggi in PBS 1X, le cellule sono state post-fissate in 1% OsO₄, disidratate mediante passaggi dei campioni in soluzioni di acetone in una scala crescente di concentrazioni e seccate con CO₂ in un *critical point drier* Balzers CPD 030. I campioni sono stati rivestiti con oro in un Balzers SCD 050 *sputter* e osservati al microscopio elettronico a scansione Cambridge S240. Questi esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

Microscopia confocale

Le AtT20 di controllo ed esposte al campo ELF-EMF sono state fatte crescere su vetrini copri oggetto trattati con poly-Lisina allo 0.01% per 24 ore. Per l'analisi dell'effetto della Nifedipina sulla espressione dei neurofilamenti, le cellule sono state invece pretrattate per 1.5 ore con 0.3 μ M Nifedipina disciolta in etanolo e poi esposte o meno al campo per 24 ore. La percentuale di etanolo finale all'interno della coltura era dello 0.4% e non risultava alterare la sopravvivenza cellulare.

In seguito le cellule sono state analizzate per immunofluorescenza diretta con phalloidin-TRIC come descritto da Bellomo (1990) o per immunofluorescenza indiretta con anticorpi anti-neurofilamenti (NF-H) e Sinaptofisina. Gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

1. eseguire 2 lavaggi in PBS 1X
2. fissare le cellule in 500 μ l/vetrino di Paraformaldeide al 4% ed incubare per 15 minuti a temperatura ambiente
3. eseguire 2 lavaggi in PBS 1X
4. trasferire 1ml di Triton 0,1% in BSA 1%/PBS 1X in ogni pozzetto e incubare per 8 minuti a temperatura ambiente (permeabilizzazione della membrana)
5. eseguire 3 lavaggi in PBS 1X
6. incubare le cellule con la soluzione di Anticorpo I (vedi Materiali, Tamponi e Soluzioni per AtT20) per 45 minuti o con la soluzione per la marcatura dell'Actina citoscheletrica per 1 ora al buio in camera umida (segue a punto 10)
7. effettuare 3 lavaggi in PBS 1X
8. incubare le cellule con la soluzione di Anticorpo II coniugato TRIC per 45 minuti al buio in camera umida
9. effettuare 3 lavaggi in PBS 1X
10. trasferire 500 μ l di soluzione contenente il marcatore dei nuclei HOECHST (1:8000 in H₂O distillata) e incubare 2 minuti a temperatura ambiente al buio

11. eseguire 3 lavaggi in PBS 1X
12. prelevare i vetrini, asciugarli e posizionarli, capovolti, su vetrini porta oggetto su gocce di una soluzione 1:1 di PBS 1X/glicerolo / 0.625% N-propilgallato
13. lasciar condensare a +4°C
14. fissare il bordo del vetrino con smalto

La fluorescenza è stata monitorata usando un Microscopio Confocale LEICA TCS 4D equipaggiato con un laser Argon Krypton e lenti ad immersioni ad olio di 40 x 1.00 e 100 x 6.00.

TEM (Transmission Electron Microscopy)

Le AtT20 di controllo ed esposte al campo ELF-EMF sono state fatte crescere su vetrini copri oggetto trattati con poly-Lisina per 24 ore. In seguito le cellule sono state fissate con glutaraldeide al 2.5% in PBS 1X (pH 7.4) per 1 ora a 4°C. Dopo due lavaggi in PBS 1X i campioni sono stati post-fissati in tetrossido di osmio 1.33% per 2 ore a 4°C. Le cellule sono state poi lavate diverse volte in PBS 1X, disidratate mediante passaggi in soluzioni di EtOH in una scala crescente di concentrazioni e poste in toluene. In seguito i campioni sono stati imbibiti in resina Epon 812 che è stata fatta poi polimerizzare in stufa a secco a 60°C per 24 ore. Dai blocchetti di resina sono state ottenute, per mezzo di un ultramicrotomo con lama di diamante, sezioni ultra sottili che sono state poi colorate con acetato di uranile. Le cellule sono state analizzate con un microscopio elettronico a trasmissione Philips CM10 (Philips, Endhoven, The Netherlands) per studiare la presenza e la localizzazione delle vescicole elettrone-dense.

Estrazione dell'RNA

Le AtT20 di controllo ed esposte al campo ELF-EMF sono state fatte crescere in fiasche da coltura cellulare per 24 ore. Per il saggio con la Nifedipina le cellule sono state pretrattate per 1.5 ore con 0.3µM Nifedipina disciolta in etanolo e poi esposte o meno al campo per

24 ore. La percentuale di etanolo finale all'interno della coltura era dello 0.4% e non risultava alterare la sopravvivenza cellulare.

Il reagente Trizol (Invitrogen) è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato che permette di isolare l'RNA totale da cellule e tessuti. Durante l'omogenizzazione e lisi del campione, il Trizol mantiene l'integrità dell'RNA distruggendo le cellule e dissolvendo le componenti cellulari. L'aggiunta di Cloroformio seguito da centrifugazione, separa la soluzione in una fase acquosa ed una fase organica. L'RNA si trova esclusivamente nella fase acquosa.

Il protocollo prevede quattro fasi:

1. SEPARAZIONE DELLE FASI

- lavare la piastra con PBS
- trasferire 1ml di Trizol nella piastra e incubare per 5 minuti a RT per consentire la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici
- aggiungere 0,2ml di Cloroformio (per 1ml di Trizol) e agitare vigorosamente i tubi eppendorf per 15 secondi e incubare per 3 minuti a RT
- centrifugare i campioni a non più di 12000 x g per 15 minuti a 2-8 °C

2. PRECIPITAZIONE DELL'RNA

- i campioni vengono separati in tre fasi, una rossa inferiore (fase fenolo-cloroformio), una intermedia ed una superiore acquosa che contiene l'RNA. Trasferire la fase acquosa in tubi puliti.
- precipitare l'RNA con 0,5ml Isopropanolo (per 1ml Trizol), agitare i tubi e incubare per 10 minuti a RT
- centrifugare a non più di 12000 x g per 10 minuti a 2-8 °C

3. LAVAGGIO DELL'RNA

- rimuovere il soprannatante e lavare l'RNA pellet con 1ml Etanolo 75% in H₂O MilliQ (per 1ml Trizol)
- vortexare, centrifugare a 7500 x g per 5 minuti a 2-8 °C

4. RISOSPENSIONE DELL' RNA

- togliere l'Etanolo e far asciugare il pellet all'aria per 5-10 minuti tenendo le eppendorf in ghiaccio
- aggiungere 50µl H₂O MilliQ
- effettuare le letture delle assorbanze a 260nm in cuvetta di quarzo utilizzando lo spettrofotometro GeneQuantPro (Amersham Biosciences)

Trascrizione inversa dell'RNA

La reazione di trascrizione inversa permette di ottenere dall'RNA di origine cellulare il cDNA corrispondente.

Il sistema utilizzato è stato quello della Trascrittasi Inversa *Im Prom-II* (Promega, Madison, WI) ed il protocollo prevede una reazione che si svolge in quattro fasi:

<i>Fasi</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Durata</i>
Incubazione iniziale	70°C	5 minuti
Incubazione	25°C	5 minuti
Trascrizione inversa	42°C	60 minuti
Inattivazione enzima	70°C	10 minuti

La fase di Incubazione iniziale si svolge in un volume di 10µl e prevede i seguenti reagenti:

Random Primers	0,5mg/ml
RNA	1µg
H ₂ O distillata	(a volume)

Le successive tre fasi si svolgono aggiungendo al volume precedente i seguenti reagenti (volume finale di 20µl):

MgCl ₂ 25mM	4μl
Im Prom-II 5X Reaction Buffer	4μl
dNTP Mix 10mM	1μl
Im Prom-II Reverse Transcriptase	1μl
Inibitore di RNasi	40u/μl

Amplificazione mediante PCR semiquantitativa

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una tecnica mediante la quale è possibile amplificare un frammento di DNA attraverso l'utilizzo di specifici inneschi. Questa tecnica è stata utilizzata per amplificare i cDNA ottenuti dalla reazione di trascrizione inversa dell'RNA estratto dai granuli cerebellari negli esperimenti in vitro. I geni analizzati sono di seguito elencati:

- **NF-H:** proteina dei neurofilamenti
- **18S:** RNA ribosomale

Sequenze usate per l'RT-PCR

Target	Primer sequence	Annealing temperature(C°)
NF-H	5'-aagtgaacacagatgctatgcg-3' 5'-ctgtcactccttcgacc-3'	62
18S	5'-ttcgggaactgaggccatgattaag-3' 5'-agtttcagcttgcaaccatactcc-3'	62

Il sistema utilizzato è stato quello della *Taq Polimerasi* (Amersham Biosciences) ed il protocollo prevede una reazione che si svolge in tre fasi:

<i>Fasi</i>	<i>Temperatura (C°)</i>	<i>Durata</i>	<i>N° cicli</i>
Denaturazione iniziale	94	2 minuti	1
Denaturazione	94	30 secondi	x cicli
Appaiamento	60	30 secondi	
Estensione	72	30 secondi	
Estensione finale	72	7 minuti	1

La reazione avviene in un volume finale di 50 µl e i reagenti utilizzati sono i seguenti:

PCR buffer (10X)	5µl
dATP 100mM	0,1µl
dTTP 100mM	0,1µl
dGTP 100mM	0,1µl
dCTP 100mM	0,1µl
Oligo up	20 pmol
Oligo down	20 pmol
Taq DNA Polimerasi 5Ku	0,3µl
H ₂ O distillata	(a volume)

METODI: NT2

Coltura: espansione e differenziamento

Le cellule NT2 indifferenziate sono state fatte crescere come monostrato in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplementato con 10% siero fetale bovino (fetal bovine serum, FBS), in incubatore a 37°C, 95% di umidità e 5% di CO₂.

Per indurre il differenziamento, una volta tripsinizzate, le cellule sono state piastrate in petri per coltura batterica nelle quali hanno formato aggregati non adesi. Dopo una notte in

incubatore le cellule sono state trattate con Acido Retinoico (RA: retinoic acid) $1\mu\text{M}$ in DMSO. Il terreno e le petri sono state cambiate ogni 3 giorni e dopo 7, 14, 21 giorni di trattamento con RA le *neurosfe* sono state trasferite in petri da coltura cellulare trattate con matrigel. Le sfere sono state tenute in coltura per una ulteriore settimana in terreno contenente AraC per fare crescere i neuriti (Cheung et al, 1999; Megiorni et al, 2005).

Apparato di esposizione

Dato un valore del campo magnetico statico esiste una finestra di frequenze di campo magnetico alternato che sono in grado di entrare in risonanza con lo ione calcio. Utilizzando una frequenza di 50Hz ci troviamo alle estremità di questa finestra di frequenze e al fine di trasferire sufficiente energia al sistema è stato necessario utilizzare una intensità di campo di 2mT. Gli esperimenti con la linea cellulare NT2 sono stati effettuati in condizioni differenti di esposizione. Lavorando sempre in condizioni di risonanza per lo ione calcio abbiamo deciso di trasferire una maggior quantità di energia diminuendo però l'intensità del campo (1mT). Per fare questo abbiamo impostato l'apparato di esposizione in modo tale che generasse una frequenza di 29Hz. Questo valore corrisponde alla frequenza di risonanza del calcio al valore del campo magnetico statico terrestre registrato in laboratorio.

Apparato di esposizione continua al campo magnetico

Le cellule sono state esposte per 7-14-21 giorni ad un campo magnetico sinusoidale di 29 Hz, ad una densità di flusso di 1 mT (rms), in un solenoide inserito all'interno di un incubatore per cellule appropriatamente ventilato e con atmosfera al 5% di CO₂. La temperatura è stata mantenuta ad un valore costante di $37\pm 0.3^{\circ}\text{C}$, e continuamente controllata mediante un termometro Hanna HI 9274 OC. I campioni di controllo sono stati collocati in un secondo incubatore dello stesso tipo di quello contenente il solenoide e nelle stesse condizioni sperimentali di temperatura, umidità e CO₂. Tutti gli esperimenti sono stati condotti alla cieca.

Il solenoide utilizzato in questo lavoro di tesi è già stato ampiamente descritto in precedenti pubblicazioni (Santoro *et al*, 1997; Lisi *et al*, 2000; Manni *et al*, 2002; Manni *et al*, 2004; Lisi *et al*, 2005). Il corpo principale del solenoide consiste in un cilindro di asbesto spesso 2 cm, avente diametro di 20 cm ed un'altezza di 40 cm. E' costituito da 1200 spire di filo di rame di 2 mm di diametro avvolte intorno al cilindro di asbesto in tre strati, procedendo in continuità da un'estremità all'altra per tre volte avanti e indietro. L'intensità di campo di 29 Hz è generata da un autotrasformatore variabile generante un flusso di densità di 1 mT (rms) per un voltaggio applicato pari a 12 Volts (rms). Il solenoide, come precedentemente detto, è stato posto in un incubatore per cellule munito di un ventilatore per un'appropriata circolazione dell'aria. Il modesto riscaldamento dovuto all'effetto *Joule* è stato quindi efficientemente disperso grazie all'azione della continua ventilazione forzata nella massa totale dell'incubatore a CO₂. Poiché una lunga permanenza a temperature più alte di quella fisiologica induce in genere nei campioni esposti la sintesi delle proteine da stress termico denominate *Heat Shock Proteins* (HSP), è stata effettuato un *Western Blot* per la proteina da shock termico HSP-70 sia sulle cellule esposte che su quelle di controllo. Questo esperimento non ha mostrato differenze di espressione della HSP-70 nei due tipi di campioni, suggerendo che le cellule esposte non vanno incontro ad uno stress indotto da un aumento della temperatura (dati non mostrati). L'intensità del campo (B), misurata con una sonda Hall, rimaneva entro il 5% del valore centrale del volume cilindrico di esposizione, che era di 11 cm x 17 cm lungo l'asse del solenoide. Il campo geomagnetico ambientale misurato era di 32 µT per la componente verticale e 16 µT per la componente orizzontale. I campi ambientali sporadici erano al di sotto di 0.1 µT

Analisi al microscopio ottico

Le cellule della linea NT2 sono state piastrate in capsule petri a bassa adesione e poste per 14 giorni in presenza (RA, retinoic acid) o assenza (CTR) dell'Acido Retinico 1µM. Contemporaneamente altre cellule sono state esposte per lo stesso periodo di tempo ad un campo di 29Hz, 1mT (EXP). In seguito le *neurosfe*re sono state trasferite in petri da

coltura cellulare trattate con matrigel e tenute in coltura per una ulteriore settimana in terreno contenente AraC. Le cellule sono state poi analizzate al microscopio ottico.

Analisi della proliferazione cellulare

Lo Ioduro di Propidio è un colorante di natura fenantridinica che quando si intercala nel DNA a doppia elica forma un complesso sufficientemente stabile che emette una fluorescenza rossa quando eccitato a 488nm. Mediante questa colorazione è possibile discriminare in una popolazione eterogenea, cellule con diverso contenuto di DNA ed in base a questo valore valutarne la distribuzione nelle fasi del ciclo cellulare anche in seguito a trattamenti farmacologici. Nel caso specifico di questo lavoro le cellule trattate sono state esposte ad un agente fisico, il campo magnetico.

Le NT2 sono state differenziate in petri da 90mm in presenza Acido Retinoico 1 μ M per 7-14-21 giorni. In parallelo altre cellule sono state poste in presenza (esposto) o assenza (controllo) del campo magnetico di 29Hz, 1mT e mantenute in coltura per lo stesso periodo di tempo. Le cellule sono state lavate due volte in PBS e fissate in una soluzione 1:1 di Metanolo-Acetone (1:5) e PBS. Dopo un ora di incubazione a 4°C le cellule sono state marcate con Ioduro di Propidio (40 μ g/ml; Sigma St. Louis, MO, USA) e trattate con RNase A (50 μ g/ml; Sigma St. Louis, MO, USA) per 30 minuti a temperature ambiente (Shapiro, 1988; Darzynkiewicz, 1997). Le cellule sono state analizzate per il contenuto di DNA tramite un FACScan (Becton Dickinson).

Estrazione dell'RNA

Le NT2 sono state differenziate in petri da coltura batterica in presenza di Acido Retinoico 1 μ M per 7-14-21 giorni. In parallelo altre cellule sono state poste in presenza (esposto) o assenza (controllo) del campo magnetico di 29Hz, 1mT e mantenute in coltura per lo stesso periodo di tempo.

L'RNA è stato estratto seguendo il protocollo di estrazione con Trizol illustrato nella sezione precedente (AtT20).

Trascrizione inversa dell'RNA

Vedi sezione precedente (AtT20).

Amplificazione del DNA mediante PCR REAL-TIME

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (PCR) e quantificazione simultanee del DNA.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti (Sybr green) che intercalano con il DNA a doppio-filamento (ds) e gli oligonucleotidi modificati del DNA (denominati sonde) che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA.

Questa tecnica è stata utilizzata per amplificare i cDNA ottenuti dalla reazione di trascrizione inversa dell'RNA ottenuto da cellule NT2 di controllo, esposte al campo ELF-EMF, differenziate con Acido Retinoico e trattate contemporaneamente con l'Acido Retinoico ed il campo di 29Hz, 1mT. I geni analizzati sono elencati di seguito:

- **NEURO D:** fattore di trascrizione
- **NESTINA:** proteina dei filamenti intermedi espressa nelle cellule staminali del sistema nervoso centrale
- **NR1:** subunità del recettore ionotropico NMDA
- **TAU:** proteina associata ai microtubuli nel CNS
- **GAPDH:** gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (gene normalizzatore)

Sequenze usate per RT-PCR Real Time:

Target	Primer sequence	Annealing temperature(C°)
NEURO D	5'-gga att cgc cca cgc agg -3' 5'-ccc atc agc cca ctc tcg -3'	60
NESTINA	5'-cac ctc aag atg tcc ctc a -3' 5'-gct gag gga agt ctt gga g -3'	58
NR1	5'-cag atg gca agt tcg gca-3' 5'-atg tct gcc tgc ccg ctg -3'	60
TAU	5'-acc aca gcc acc ttc tcc-3' 5'-caa ccc gta cgt ccc agc -3'	58
GAPDH	5'- cat cat ctc tgc ccc ctc t -3' 5'-caa agt tgt cat gga tga cct -3'	60

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il sybergreen come fluoroforo che intercalandosi alle doppie eliche di DNA, man mano che vengono sintetizzate, permette la quantificazione del cDNA di partenza. I dati sono stati analizzati usando l'equazione descritta da Livak et al.(2001), secondo la quale la quantità di cDNA del campione trattato rispetto a quello non trattato è uguale a $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dove:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ del gene target} - Ct \text{ del gene normalizzatore GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ del campione trattato} - \Delta Ct \text{ del campione non trattato})$$

Per esempio se il ΔCt del campione trattato è 4 e quello del campione non trattato è 3, avremo:

$$\Delta\Delta Ct = 3-4 = -1$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^1 = 2$$

Questo valore indica che il cDNA di partenza del campione trattato era il doppio rispetto a quello non trattato.

Prima di poter usare l'equazione $\Delta\Delta C_t$ per la quantificazione dei cDNA di nostro interesse, abbiamo eseguito un esperimento di taratura per verificare che l'efficienza di retrotrascrizione dei geni target e del gene normalizzatore erano paragonabili. Le PCR Real Time sono state condotte usando Sybr Green I Master mix (Applied Biosystems) con lo strumento ABI PRISM™ 7000 Sequence Detection System. Ogni reazione veniva condotta in triplicato utilizzando 0,5 µl di cDNA e 250nM di primers in un volume di 25 µl.

I parametri di PCR sono i seguenti:

Fasi	Temperatura	Durata	N° cicli
Attivazione della DNA polimerasi	95°C	2 minuti	1
Denaturazione Appaiamento allungamento	95°C 60°C	15 secondi 1 secondi	40 cicli

RISULTATI

Il fine di questa tesi è stato quello di studiare l'effetto della esposizione al campo ELF-EMF (50Hz 2mT; 29 Hz, 1mT) su i processi di differenziamento neuronale avvalendomi di due modelli cellulari.

La prima linea cellulare utilizzata è stata quella delle AtT20/D16V. Queste sono cellule di origine murina e sono state caratterizzate e studiate come modello *in vitro* di cellule neuroendocrine.

Il secondo modello è rappresentato dalla linea cellulare di teratocarcinoma umano, NTera-2 cl.D1. Queste cellule sono pluripotenti e costituiscono una valida ed interessante alternativa all'utilizzo delle cellule staminali embrionali umane.

1. AtT20: primo modello cellulare

1.1. Analisi dell'effetto dell'esposizione al campo magnetico sulla variazione del $[Ca^{2+}]_i$ e del pH_i

Nel grafico, riportato in figura 7.A, è rappresentato il tipico trend con cui variavano la concentrazione del calcio ($[Ca^{2+}]_i$) ed il pH intracellulare della linea AtT20 in seguito all'esposizione ad un campo di 50Hz e 2mT. L'andamento di questi valori su singole cellule marcate con le sonde indo1 e SNARF, è stato monitorato prima (0-300s) e durante l'esposizione (300s-660s) al campo magnetico.

In assenza del campo applicato le intensità di fluorescenza registrate risultavano non subire variazioni fino ad almeno 600s e questi dati corrispondono nel grafico a valori costanti di $[Ca^{2+}]_i$ e pH_i . Durante l'esperimento il campo era è stato acceso a 300s e da quel momento in poi è stata messa in evidenza e registrata una variazione della intensità di fluorescenza della sonda indo1 che corrispondeva a un rapido e significativo aumento del $[Ca^{2+}]_i$ il quale risultava essere di entità diversa tra cellula e cellula. Questo risultato era è stato poi confermato, sulle stesse cellule, seguendo l'andamento della intensità di fluorescenza per la sonda SNARF corrispondente al pH_i . Infatti in concomitanza all'aumento del $[Ca^{2+}]_i$ risultava esserci una diminuzione nel valore del pH dovuto al rilascio dei protoni dai sistemi tampone intracellulari (scambiatore Ca^{2+}/H^+ sulla membrana mitocondriale interna) (Berridge et al, 2003).

Nelle figure 7.B e C è mostrata l'analisi statistica effettuata sui valori relativi alla $[Ca^{2+}]_i$ e del pH_i eseguita su 500 cellule prese da tre set di esperimenti diversi.

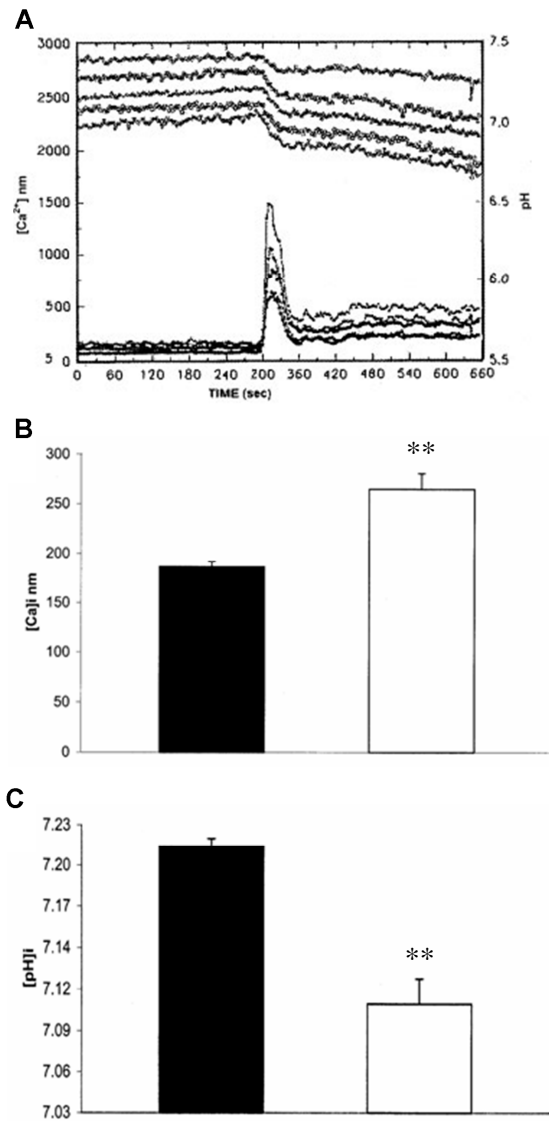


Fig. 7. “Steady state” e analisi statistiche sulla determinazione fluorimetrica degli effetti del campo ELF-EMF sulla $[Ca^{2+}]_i$ e pH_i delle cellule AtT20 D16V. (A) esperimento di cinetica effettuato su cinque cellule marcate con la sonda per il calcio, indo1, e per il pH, SNARF. Il campo è stato acceso a 300s e l’esperimento monitorato fino a 660s. (B,C) rappresentazione dei dati sperimentali e test di t-Student (**, $p < 0.001$) per il $[Ca^{2+}]_i$ (B) e pH_i (C) di tre set di esperimenti indipendenti per un totale di 500 cellule analizzate. Barre nere, cellule di controllo; barre bianche esposti al campo di 50Hz, 2mT.

1.2. Analisi morfologica e organizzazione del citoscheletro in cellule AtT20 esposte al campo ELF-EMF

È noto che le cellule della linea AtT20 D16V dopo cinque giorni di cultura assumono una forma poligonale e presentano lunghi processi simil-neuritici con coni di accrescimento a livello dei quali si accumulano i granuli secretori di ACTH (Tooze et al, 1989).

L'analisi con il microscopio elettronico a scansione (SEM: *scanning electron microscopy*) ha mostrato che l'esposizione ad un campo di 50Hz, e 2mT per 24 ore induce nelle AtT20 un cambiamento morfologico e una precoce formazione di strutture simili a neuriti (Fig.8.B) rispetto alle cellule di controllo (Fig.8.A).

La morfologia di una cellula dipende dall'organizzazione del suo citoscheletro e visti i dati ottenuti con il SEM quello che ci si aspettava è che il campo determinasse una diversa organizzazione dei microfilamenti di actina rispetto ai controlli. Utilizzando la microscopia confocale e marcando l'F-actina (actina filamentosa) con un marcatore specifico, la tossina falloidina, abbiamo studiato l'organizzazione del citoscheletro nelle cellule AtT20. I risultati dell'analisi ottenuti con immunofluorescenza diretta hanno messo in evidenza cambiamenti morfologici nelle cellule esposte (Fig.8.D) correlati ad una riorganizzazione dell'actina. I microfilamenti di actina, uniformemente distribuiti al livello del corpo cellulare, risultano nelle cellule di controllo (Fig.8.C) accumulati principalmente a livello della membrana plasmatica.

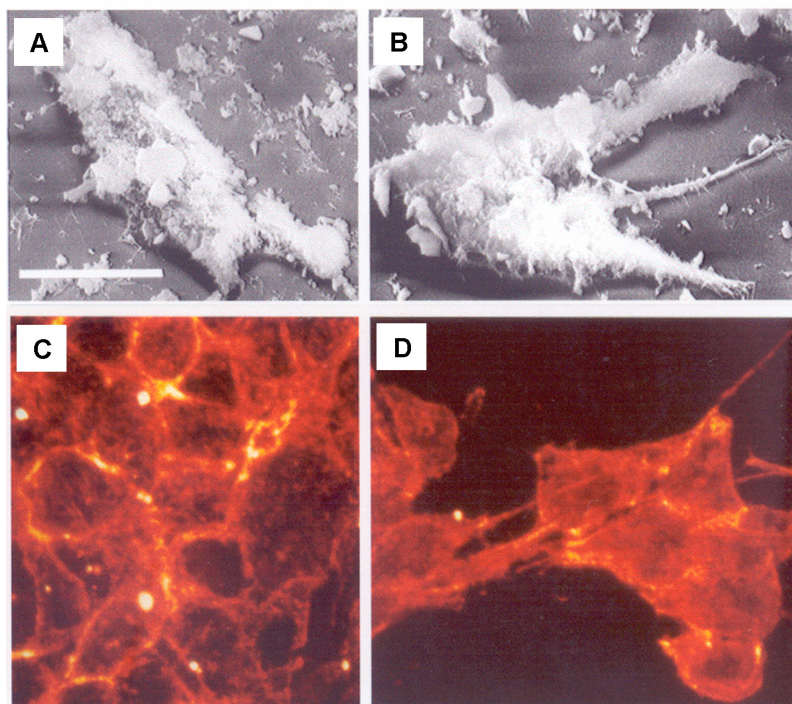


Fig. 8. Analisi mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) e microscopia confocale degli effetti del campo ELF-EMF sulla morfologia delle cellule AtT20 D16V. Immagini effettuate al SEM che mostrano la morfologia di cellule di controllo (**A**), e cellule esposte al campo di 50Hz, 2mT per 24 ore (**B**). Distribuzione dei microfilamenti di actina marcati con la falloidina-TRIC nelle cellule di controllo (**C**) ed esposte (**D**). La banda bianca in **A** corrisponde a 25 μ m.

1.3. Analisi mediante immunofluorescenza indiretta dell'effetto del campo di 50Hz, 2mT sulla distribuzione della proteina NF200

Come precedentemente detto l'esposizione ad un campo di 50Hz, 2mT induce nelle AtT20, già nelle prime 24 ore di coltura, una precoce formazione di strutture simili a neuriti. L'analisi mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando il microscopio confocale ha dimostrato che queste strutture in realtà sono neurofilamenti a tutti gli effetti in quanto risultano positive per le proteine NF-H ad alto peso molecolare (Fig.9.B) (Ab anti-NF200) e che la loro quantità è maggiore rispetto alle cellule di controllo (Fig.9.A).

Le AtT20 sono cellule eccitabili, esprimono quindi sulla membrana plasmatica i canali del calcio voltaggio dipendenti di tipo L (L-type VSCC: voltage gated calcium channel). La Nifedipina è un antagonista specifico di questi canali (Morgado-Valle et al, 1998). Il pretrattamento delle AtT20 con Nifedipina 0.3 μ M determina nelle cellule esposte al campo magnetico una diminuzione della espressione di NF-H rispetto alle cellule esposte non trattate (Fig.9.D e B).

Le cellule pretrattate con la Nifedipina, sia di controllo che esposte (Fig.9.C e D), non mostrano invece sostanziali differenze nella espressione della proteina dei neurofilamenti rispetto al controllo non trattato (Fig. 9.A).

Nella tabella 3 è riportata la percentuale di cellule positive ad NF-H e l'analisi statistica dei dati.

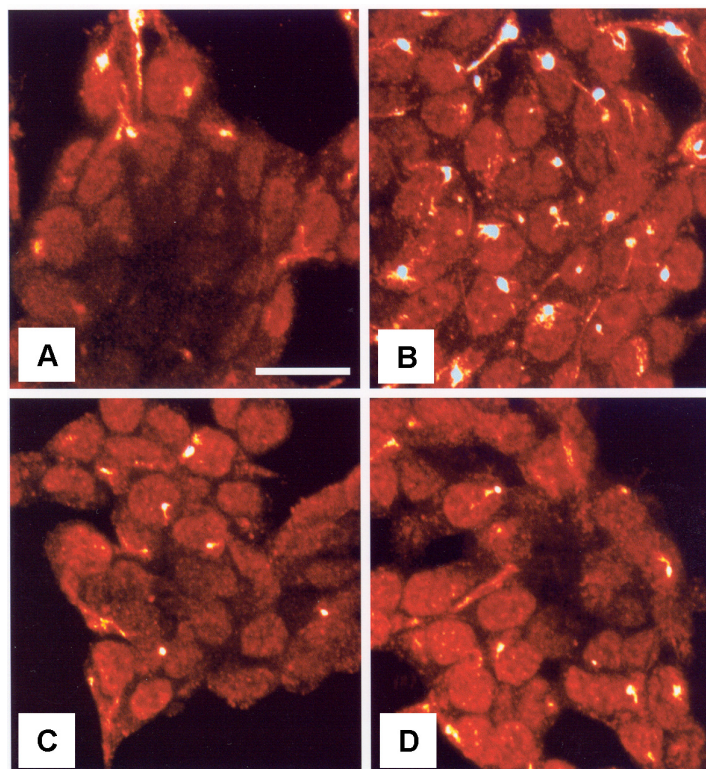


Fig. 9. Analisi effettuata mediante microscopia confocale che mostra gli effetti del campo ELF-EMF sulla espressione della proteina dei neurofilamenti NF-H (200KDa) nelle cellule AtT20 D16V in assenza e presenza dell'antagonista dei canali del calcio di tipo L (L-type VGCC), Nifedipina 0.3 μ M. Nella figura sono mostrate le cellule di controllo (A), cellule esposte al campo magnetico per 24 ore (B), cellule di controllo (C) e cellule esposte (D) pretrattate con la Nifedipina. La banda bianca in figura A corrisponde a 25 μ m.

	% Cellule positive ai Neurofilamenti
Ctr	18±0.3
Ctr + Nifedipina ^a	6±0.2
Esposto ^b	65±0.2*
Esposto + Nifedipina ^c	15±0.3*

± Le analisi statistiche delle cellule positive a NF200 sono state effettuate con il test di t-Student con *P<0.05

^aCellule trattate con Nifedipina 0.3µM per 1.5h

^bCellule trattate solo con campi ELF-EMF per 24h

^cCellule trattate con Nifedipina Nifedipina 0.3µM per 1.5h e poi esposte ai campi ELF-EMF per 24h

Tabella 3. Percentuale delle cellule AtT20 positive alla proteina NF-H e analisi statistica

1.4. Analisi mediante RT-PCR dell'espressione di NF200

I risultati ottenuti in immunofluorescenza indiretta sono stati poi riconfermati mediante tecnica di RT-PCR. Come si può osservare in figura 10, l'esposizione delle cellule AtT20 ad un campo di 50Hz, 2mT determinava un aumento dell'espressione del gene codificante per NF-H (banda da 460bp) (exp) rispetto ai controlli (ctr). Il pretrattamento delle cellule con Nifedipina 0.3µM (exp nif) induce una cospicua diminuzione d'intensità della banda relativa al gene per la proteina dei neuro filamenti, rispetto ai controlli (ctr nif). L'espressione del gene per la proteina ribosomale 18s era stata utilizzata come controllo endogeno.

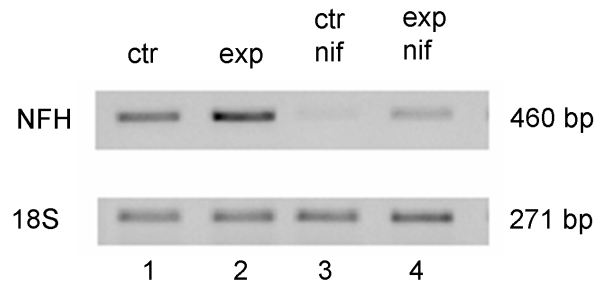


Fig.10. Analisi mediante RT-PCR dell'effetto dell'esposizione al campo di 50Hz, 2mT sulla espressione di NF-H nelle cellule AtT20 D16V. Nella colonna 1 sono riportate le bande relative a NF-H (amplicone di 460 paia di basi) e 18s (amplicone di 271 paia di basi) (normalizzatore) per le cellule di controllo, nella colonna 2 per le cellule esposte per 24 ore al campo magnetico. Nelle colonne 3 e 4 rispettivamente il controllo pretrattato con Nifedipina ed esposto pretrattato con Nifedipina.

1.5. Analisi della distribuzione della sinaptofisina

La sinaptofisina è una glicoproteina di membrana presente nelle piccole vescicole presinaptiche e per la sua distribuzione viene considerata un marcatore del differenziamento neuronale (Quatacker et al, 1998).

In figura 11 è mostrata l'analisi mediante microscopia confocale dell'effetto dell'esposizione al campo ELF-EMF sulla distribuzione citoplasmatica della sinaptofisina. Il campo magnetico di 50Hz, 2mT determina un aumento generale della espressione del marcatore, visibile come un aumento della fluorescenza per l'anticorpo anti-sinaptofisina, ed in particolare si osserva un accumulo nei coni di crescita dove la positività diventa più rilevante (Fig. 11.B). Nei controlli, al contrario, la sinaptofisina risulta essere uniformemente distribuita a livello dei compartimenti citoplasmatici (Fig. 11.A). Nella tabella 4 è riportata l'analisi statistica dei dati relativi alla percentuale di positività delle cellule alla sinaptofisina in seguito ad una esposizione di 24 e 48 ore.

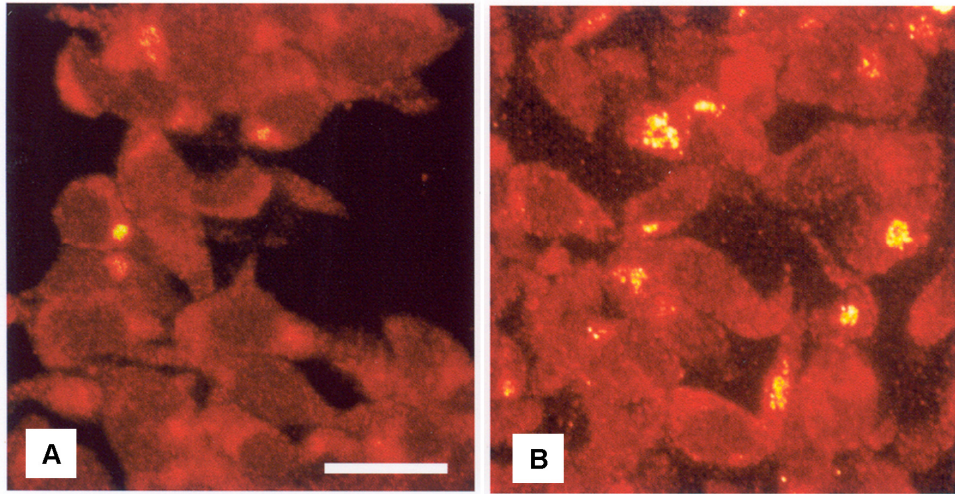


Fig. 11. Analisi mediante microscopia confocale degli effetti del campo ELF-EMF sulla espressione della sinaptofisina nelle cellule AtT20 D16V. Le immagini in immunofluorescenza indiretta mostrano la distribuzione della glicoproteina nelle cellule di controllo (**A**), e in cellule esposte al campo di 50Hz, 2mT per 48 ore (**B**). La banda bianca in **A** corrisponde a 25 μ m.

	% Cellule positive alla Sinaptofisina
Ctr	2 \pm 0.3
Esposto 24h	15 \pm 0.2*
Esposto 48h	32 \pm 0.2*

\pm Le analisi statistiche delle cellule positive alla Sinaptofisina sono state effettuate con il test di t-Student con
*P<0.05

Tabella 4. Percentuale delle cellule AtT20 positive alla proteina sinaptofisina ed analisi statistica dei dati.

1.6. Effetto della esposizione ai campi ELF-EMF sulla distribuzione delle vescicole secretorie

A conferma di questo risultato ulteriori analisi erano state effettuate mediante microscopio elettronico a trasmissione (TEM: *transmission electron microscopy*). Un aumento di granuli secretori (Fig. 12.B) è stato messo in evidenza nel citoplasma delle cellule esposte rispetto ai controlli (Fig. 12.A). Infatti dopo solo 24 ore di esposizione è visibile un maggior numero di piccole vescicole elettron-dense a livello del pericarion e della membrana citoplasmatica rispetto ai controlli non esposti.

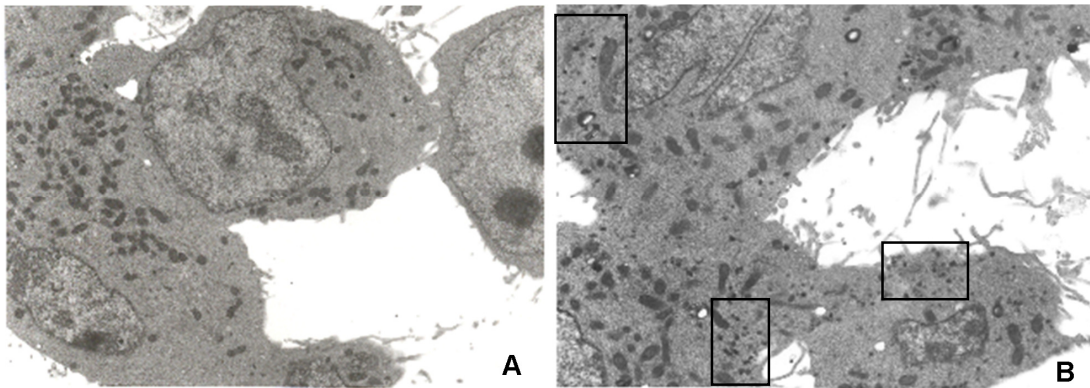


Fig. 12. Analisi mediante TEM degli effetti del campo ELF-EMF sulla formazione dei granuli secretori nelle cellule AtT20 D16V. Le immagini mostrano una maggior quantità di vescicole elettron-dense nelle cellule esposte per 24 ore al campo (**B**), rispetto alle cellule di controllo (**A**). Nei riquadri sono mostrati gli accumuli di granuli a livello della membrana plasmatica e della regione perinucleare delle cellule esposte (**B**).

2. NT2: secondo modello cellulare

2.1. Analisi morfologica delle cellule NT2 esposte ad un campo di 29hz, 1mT

Le cellule della linea NT2 sono state piastrate in capsule petri a bassa adesione in modo tale che formassero *neurosfe* e poste per 14 giorni in presenza o assenza del campo di 29Hz, 1mT. Parallelamente altre cellule sono state differenziate con Acido Retinoico 1 μ M per lo stesso periodo di tempo. In seguito le cellule sono state piastrate su matrigel in presenza di AraC, che consente la crescita dei neuriti, e a distanza di una settimana sono state osservate al microscopio ottico. Nelle figure 13.A e B sono mostrate le NT2 di controllo ed in particolare sono visibili due sfere in adesione contornate da un monostato di cellule con la caratteristica morfologia della linea. Cellule di questo tipo sono presenti anche nei campioni esposti (Fig. 13.C) ma rispetto ai controlli si può osservare come il campo di 29Hz, 1 mT induca la formazione di alcune strutture simil neuritiche (Fig. 13.D). I neuriti, come si può vedere in figura 13.E ed F, sono ben visibili nelle cellule differenziate con Acido Retinoico dove si sviluppano in una fitta rete.

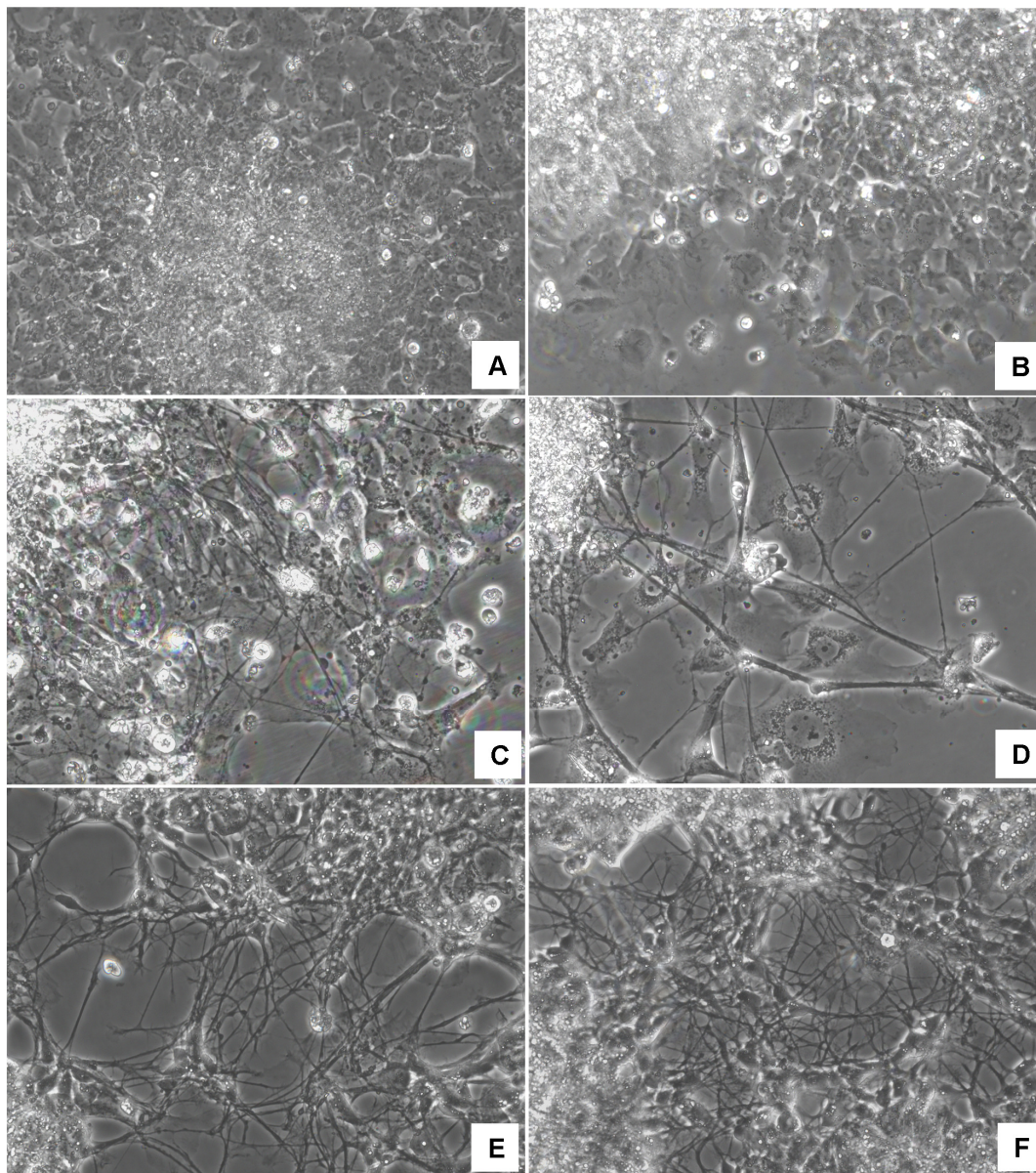


Fig. 13. Analisi mediante microscopio ottico degli effetti del campo ELF-EMF sulle cellule NT2 dopo 14 giorni di coltura. Nei campioni esposti al campo di 29Hz, 1mT (**C**, **D**) si può vedere la presenza di strutture simil neuritiche assenti nei campioni di controllo (**A**, **B**). Nelle immagini **E** ed **F** si può osservare la fitta rete di neuriti che si forma nelle cellule differenziate con trattamento chimico (Acido Retinico 1µM).

2.2. Analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria

Le cellule NT2, sono state piastrate in petri a bassa adesione ed esposte (exp) o meno (ctr) al campo di 29HZ, 1mT per 7-14-21 giorni. Contemporaneamente altre cellule sono state trattate con Acido Retinoico (RA) per lo stesso periodo di tempo. Le cellule sono state fissate e marcate con Ioduro di Propidio e analizzate mediante citofluorimetria. In figura 14 è mostrata l'analisi del ciclo cellulare dove sono riportate le percentuali delle cellule nelle fasi G₂/M, S e G₀/G₁. Nei campioni di controllo si può osservare come al tempo 0 (T0) la percentuale delle cellule nelle fasi S e G₀/G₁ sia all'incirca la stessa (42 e 48%) mentre questo rapporto cambia nei tempi successivi. A 7 giorni la fase G₀/G₁ aumenta mentre la fase S diminuisce e questi valori rimangono costanti a 14 e 21 giorni. Nelle cellule esposte al campo di 29Hz, 1mT si osserva a 7 giorni, rispetto ai controlli, un aumento della percentuale delle cellule in fase S e nei tempi successivi, 14 e 21 giorni, un aumento della percentuale di cellule in fase G₀/G₁, indice di differenziamento. Questo pattern è molto simile a quello osservato nelle cellule differenziate con l'Acido Retinoico (RA).

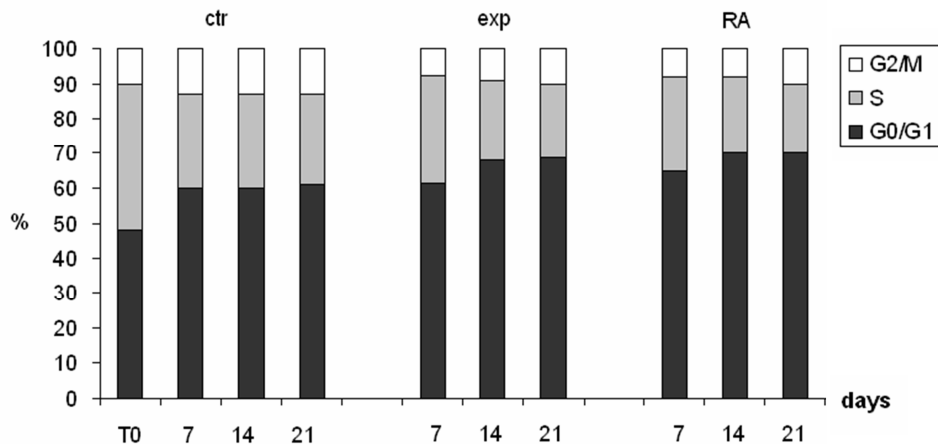


Fig.14. Studio del ciclo cellulare mediante analisi al FACS. Le cellule NT2 di controllo (ctr), esposte al campo ELF-EMF (exp) e differenziate con Acido Retinico (RA) sono state analizzate ed i dati rappresentati come percentuale delle fasi del ciclo cellulare, rispetto alla popolazione totale. La figura mostra le cellule nelle fasi G₂/M, S e G₁/G₀ dopo 7, 14, 21 giorni di coltura.

2.3. Analisi quantitativa mediante Real Time PCR dell'espressione dei marcatori neuronali in cellule esposte al campo di 29 Hz, 1mT

In figura 15 è mostrata l'analisi quantitativa effettuata mediante Real Time PCR dei livelli di espressione dell'mRNA di alcuni marcatori precoci (NeuroD e Nestina) e tardivi (NR1 e TAU) del differenziamento neuronale normalizzati rispetto al gene GAPDH. Per ogni marcatore (NeuroD, Nestina, NR1, TAU) è mostrato l'andamento dell'espressione dell'mRNA estratto dalle cellule NT2 di controllo ed esposte al campo di 29Hz, 1mT (Fig. 15.A, C, E, G) e poi confrontate con le cellule differenziate con Acido Retinico 1µM (Fig. 15.B, D, F, H).

Il campo ELF-EMF determina nelle cellule esposte un graduale aumento dell'mRNA per il fattore di trascrizione NEURO D a 7, 14, 21 giorni e questo incremento è statisticamente significativo rispetto al controllo (Fig. 15.A). Al contrario nelle NT2 differenziate con Acido Retinico il marcatore è fortemente up regolato a 7 giorni ma la sua espressione diminuisce nei tempi successivi e a 21 giorni il suo valore si avvicina a quello dei campioni esposti al campo (Fig. 15.B).

L'mRNA della nestina risulta essere up regolato dopo 7 giorni di esposizione al campo di 29Hz, 1mT e a 14 giorni questo valore subisce una lieve diminuzione mantenendosi però piuttosto costante fino ai 21 giorni (Fig.15.C). L'andamento ed i valori dell'espressione della nestina nelle cellule esposte sono molto simili a quelli osservati nelle cellule differenziate con Acido Retinico. Successivamente ad un forte aumento dell'espressione del marcatore a 7 giorni, si osserva però a 21 giorni, a differenza dei campioni esposti al campo ELF-EMF, una sua progressiva diminuzione (Fig.15.D).

Il campo di 29Hz, 1mT induce un graduale incremento dell'espressione dei marcatori tardivi NR1 (Fig.15.E) e TAU (Fig.15.G) rispetto ai controlli e questi valori sono statisticamente significativi. L'andamento della espressione dei due marcatori è simile a quella osservata nelle cellule differenziate con Acido Retinoico nei quali però gli mRNA di NR1(Fig.15.F) e TAU (Fig.15.H) sono maggiormente espressi.

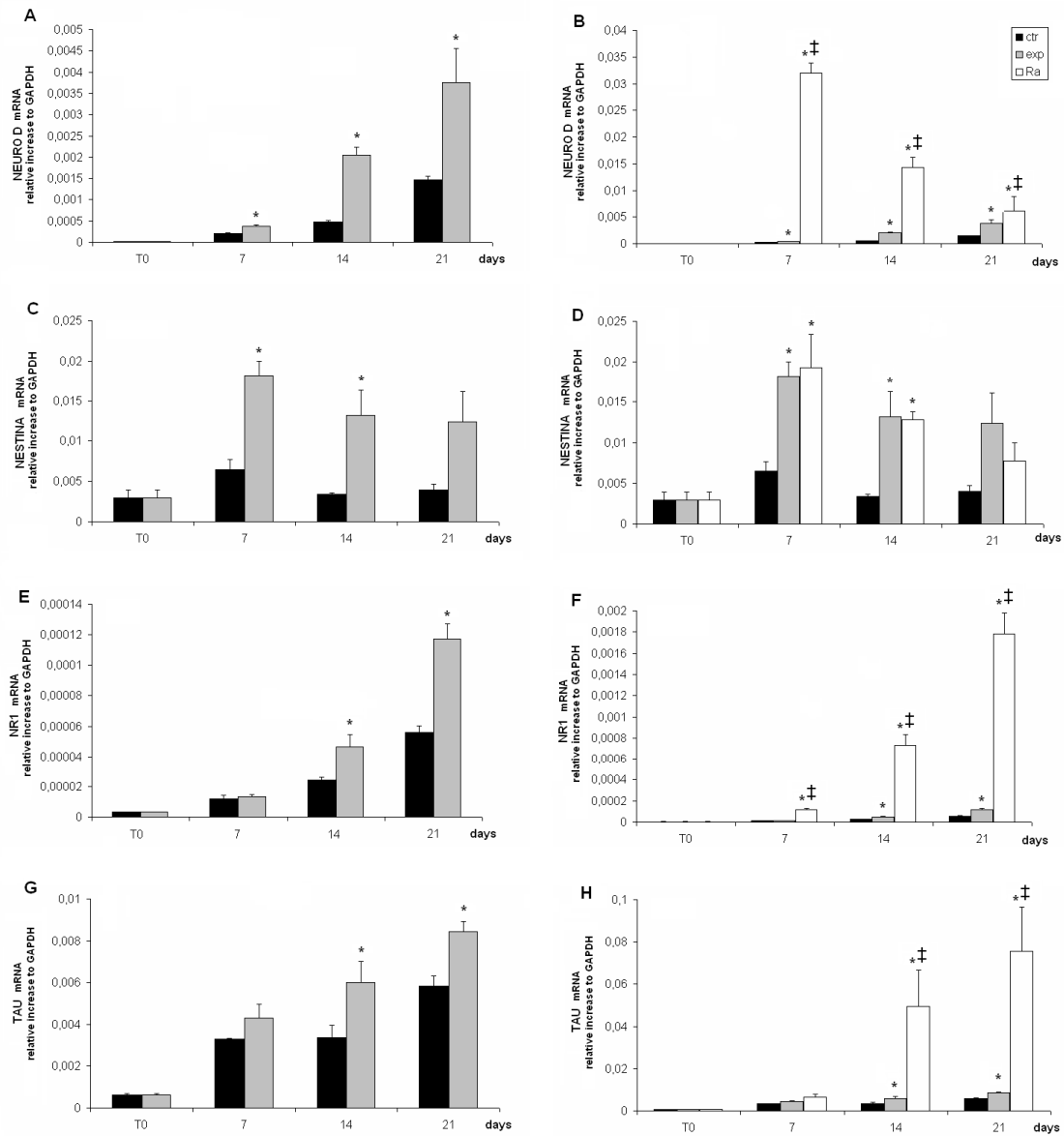


Fig.15. Analisi quantitativa mediante Real Time PCR dell'espressione dei marcatori del differenziamento neuronale Neuro D (A, B), Nestina (C, D), NR1 (E, F), TAU (G, H). Nei pannelli A, C, E, G è mostrato l'incremento dell'mRNA rispetto al controllo endogeno GAPDH dei campioni di controllo (ctr) ed esposti al campo di 29Hz, 1 mT (exp) dopo 7-14-21 giorni di coltura. Nei pannelli B, D, F, H sono rappresentati gli stessi campioni confrontati con le cellule NT2 differenziate con Ra 1µM. T-student $p < 0,05$; *: exp o Ra verso il ctr, ‡: Ra verso exp.

DISCUSSIONE

La linea cellulare AtT20 D16V è un modello di neurone peptidergico ed è interessante in quanto differenzia spontaneamente *in vitro* dopo 5 giorni di coltura. La maturazione è caratterizzata dalla formazione di lunghi processi neuritici con coni di accrescimento nei quali si accumulano granuli secretori contenenti ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Tooze et al, 1989).

Queste cellule neuroendocrine sono elettricamente eccitabili ed esprimono canali del Ca^{2+} voltaggio dipendente. Dato che è stato dimostrato che il campo magnetico a frequenza estremamente bassa determina variazioni nella concentrazione del calcio intracellulare (Liboff 1985a,b; Blackman et al, 1985), il primo obiettivo è stato quello studiare l'effetto del campo di 50Hz, 2mT d'intensità sul flusso del calcio. Gli esperimenti sono stati effettuati marcando le cellule AtT20 con due sonde fluorescenti raziometriche che legano in maniera specifica lo ione calcio e lo ione H^+ e sono rispettivamente indo1 e SNARF. Questi fluorofori, date le loro caratteristiche, mi ha permesso di monitorare in tempo reale i cambiamenti di $[\text{Ca}^{2+}]$ e di pH intracellulare in cellule esposte al campo magnetico. I dati ottenuti hanno mostrato che l'accensione del campo imposto, dopo 300s di registrazione del segnale, determina un aumento immediato della concentrazione del calcio intracellulare (Fig. 7.A), portandolo da un valore basale medio di 180nM a quello di 265nM (Fig. 7.B). Contemporaneamente è stata registrata una diminuzione nel valore del pH e questo è dovuto al rilascio di ioni idrogeno dai sistemi tampone intracellulari come il Mitocondrio (Fig. 7.C).

Lo ione calcio svolge un ruolo centrale nella biologia della cellula, ad esempio per quanto riguarda la polimerizzazione dell'actina o il differenziamento cellulare. Le AtT20 che differenziano verso il tipo neuronale subiscono un cambiamento morfologico e questo fenomeno risulta essere accelerato nelle cellule esposte al campo per 24 ore. Come si può

vedere nelle immagini acquisite al SEM, le AtT20 trattate hanno infatti una forma più poligonale e si possono vedere strutture filamentose simili ai neuriti che nelle cellule di controllo sono assenti (Fig. 8.B e A).

La marcatura del citoscheletro con la tossina falloidina, che lega in maniera specifica la forma filamentosa dell'actina, mi ha permesso di mettere in relazione i cambiamenti osservati nelle AtT20 esposte al campo ELF-EMF ad una riorganizzazione dell'actina a livello citoplasmatico. Se nelle cellule di controllo la microscopia confocale mostrava un accumulo di actina a livello della membrana plasmatica (Fig. 8.C), il campo magnetico di 50Hz, 2mT, determinava invece, dopo 24 ore, una riorganizzazione dei microfilamenti di actina che si presentavano distribuiti in maniera più uniforme a livello del citoplasma (Fig. 8.D).

Le cellule AtT20 sono, come abbiamo già accennato, un modello di cellula neuroendocrina ed esprimono, una volta differenziate, i tipici filamenti intermedi delle cellule neuronali, i neurofilamenti. Le analisi effettuate con microscopia confocale e PCR semiquantitativa hanno mostrato che una esposizione di 24 ore al campo magnetico determinava nelle AtT20 un cospicuo aumento nella espressione della subunità di NF-H (Fig. 9.B e Fig. 10, colonna 2). Dato che i primi risultati ottenuti riguardavano la fluttuazione del calcio dovuta alla esposizione al campo magnetico, ho deciso di studiare il possibile coinvolgimento dei canali del calcio di tipo L (*L-type Voltage gated calcium channels*) sull'espressione di NF-H. A tal fine le cellule AtT20 sono state trattate con un antagonista dei canali L-type VGCC. La Nifedipina è stata usata alla concentrazione di 0,3 μ M ed è stata fornita prima dell'esposizione al campo ELF-EMF. Il farmaco ha determinato una forte diminuzione nell'espressione di NF-H che era stato invece up regolato dalla esposizione al campo per 24 ore (Fig. 9.D e Fig. 10, colonna 4). Questi risultati nel loro insieme sembrano supportare l'ipotesi che il principale target del campo magnetico in questo sistema siano gli L-type VGCC.

I risultati ottenuti dimostrano quindi che le cellule esposte assumono precocemente le caratteristiche dei neuroni peptidergici. Questo dato è stato supportato dalle analisi effettuate con microscopia confocale (Fig. 11) ed elettronica a trasmissione (Fig. 12) svolte al fine di studiare la presenza e l'accumulo di vescicole sinaptiche e granuli elettron-densi. Nelle cellule esposte al campo di 50Hz, 2mT per 48 ore si è osservata una maggiore

positività per la sinaptofisina, glicoproteina delle piccole vescicole sinaptiche (Fig. 11.B), rispetto ai controlli (Fig. 11.A) e questo marcatore era maggiormente accumulato a livello dei coni di crescita. L'analisi al TEM ha mostrato che le cellule AtT20 esposte al campo magnetico per 24 ore (Fig. 12.B) hanno un maggior numero di granuli secretori elettron-densi rispetto ai controlli (Fig. 12.A) e questi erano soprattutto accumulati a livello della membrana plasmatica e nella regione attorno al nucleo.

Per concludere i dati raccolti supportano l'ipotesi che l'esposizione delle cellule della linea cellulare AtT20 D16V per 24 ore ad un campo di 50Hz, 2mT sia in grado di indurre un precoce differenziamento neuronale. Questo effetto è stato valutato in termini di espressione di marker tipicamente neuronali che risultano essere espressi in seguito alla esposizione delle cellule al campo magnetico. Presumibilmente i cambiamenti nella fisiologia, morfologia, e biochimica cellulare sono dovuti al passaggio attraverso la membrana di calcio che in queste cellule avviene principalmente per apertura dei canali voltaggio dipendenti di tipo L.

Le cellule NT2 sono una linea ottenuta dal teratocarcinoma umano, sono quindi cellule di carcinoma embrionale (EC, *embryonal carcinoma*) considerate la controparte maligna delle cellule staminali embrionali (ES, *embryonal stem*). Quando vengono trattate *in vitro* con Acido Retinoico differenziano in diversi tipi cellulari tra i quali i neuroni post mitotici del sistema nervoso centrale.

I protocolli utilizzati inizialmente per il differenziamento delle NT2 non permettevano di ottenere elevate percentuali di neuroni ma l'introduzione della tecnica delle colture primarie insieme alla somministrazione del differenziante chimico (RA) permise di ottenere colture pure (>95%) di cellule neuronali (Pleasure et al, 1992). Tuttavia il differenziamento delle NT2 tramite questa tecnica richiedeva lunghi periodi di tempo (6 settimane). Il protocollo che ho utilizzato in questo lavoro di tesi è stato quello sviluppato da Cheung e colleghi (1999). Il metodo è detto di aggregazione cellulare (in neurosfere) ed è stato dimostrato promuovere il differenziamento indotto da Acido Retinoico consentendo di ottenere neuroni da colture di NT2 in sole due settimane. Anche se l'aggregazione è in grado di indurre cambiamenti biochimici di tipo neuronale in presenza di basse concentrazioni di RA, di per sé non è comunque in grado di portare allo sviluppo del

fenotipo neuronale. Inoltre in nessun modo la coltura in forma di neurosfere può sostituire l'Acido Retinoico come fattore che dà inizio al differenziamento.

In questa tesi sono mostrati i dati preliminari che riguardano gli effetti dell'esposizione della linea NT2 al campo magnetico ELF. Le cellule sono state poste in capsule petri a bassa adesione in modo tale che formassero aggregati cellulari, detti sfere, e trattati o con Acido Retinoico $1\mu\text{M}$, o col campo magnetico di 29 Hz, 1 mT per 14 giorni. Nelle figure 13.A e B sono mostrati due campioni di controllo mantenuti in coltura per due settimane in forma di aggregati e poi piastrati su matrigel in presenza di AraC, che consente la crescita dei neuriti. Come si può osservare nelle immagini a contrasto di fase le cellule che derivano dalle sfere sono grandi, appiattite, con nuclei di forma irregolare con nucleoli prominenti ed assomigliano alle cellule della linea originale. Al contrario nelle figure 13.C e D si può osservare come dalle sfere che sono state esposte al campo magnetico per 14 giorni, fuoriescano, oltre a cellule del tutto simili a quelle mostrate in figura 13.A e B, cellule che sono in grado di formare lunghe strutture simil neuritiche totalmente assenti nei campioni di controllo. Il trattamento delle neurosfere con Acido Retinoico $1\mu\text{M}$ determina invece, come è ben visibile in figura 13.E ed F, la formazione di una fitta rete di neuriti che interconnettono i diversi elementi che hanno un caratteristico piccolo corpo cellulare. Se come precedentemente detto l'aggregazione cellulare non può sostituire l'agente chimico (RA) nell'indurre il differenziamento neuronale, i primi risultati che ho ottenuto con questo metodo mostrano invece come un agente fisico, quale il campo magnetico, possa essere invece un iniziatore di tale processo.

Il trattamento delle NT2 con Acido Retinoico risulta nell'upregolazione degli specifici fattori di trascrizione bHLH e di altri marcatori neuronali; questi eventi sono accompagnati dall'arresto delle cellule in fase G_1 e dalla loro conseguente uscita dal ciclo cellulare come dimostrato dall'aumento dei livelli d'espressione dell'inibitore della chinasi ciclica dipendente (CDK2) $p27^{\text{Kip1}}$ (Andrews, 1984; Megiorni et al, 2005). In figura 14 sono riportati i dati riguardanti l'analisi del ciclo cellulare effettuato tramite marcatura con ioduro di propidio. Si può osservare come l'esposizione al campo magnetico di 29 Hz, 1 mT determini nelle NT2 una variazione delle percentuali delle cellule nelle fasi G_2/M , S e G_1/G_0 caratterizzate da un aumento a 7 giorni della fase S, rispetto al controllo, e a 14 e 21 giorni delle fasi G_1/G_0 . Lo stesso pattern è stato riscontrato nelle cellule trattate con Acido

Retinoico $1\mu\text{M}$ e questo risultato suggerisce, insieme ai dati precedentemente mostrati, che il campo ELF può essere in grado di agire come un differenziante fisico.

Se l'utilizzo della linea AtT20 mi ha permesso di studiare l'effetto del campo magnetico sulla maturazione dei neuroni peptidergici, l'impiego delle cellule NT2 mi ha invece consentito di spostare l'attenzione sulle fasi precoci del differenziamento neuronale. Come è già stato precedentemente spiegato i neuroni ottenuti dalla linea NTERA 2 sono cellule post mitotiche, con un fenotipo polarizzato che mantengono la plasticità dei neuroni immaturi in quanto rigenerano i neuriti in seguito a successivi piastramenti (Pleasure et al, 1992). Proprio perché non completamente mature, esprimono principalmente i marcatori neuronali precoci ed invece in minor percentuale i marcatori tardivi (vedi introduzione). Dato che il mio obiettivo è stato quello di studiare in maniera generale l'effetto dell'esposizione al campo magnetico ELF sul differenziamento neuronale, ho deciso di analizzare sia marcatori precoci, NeuroD e Nestina, che marcatori tardivi, NR1 e TAU.

In letteratura è riportato che subito dopo l'induzione del differenziamento *in vitro* delle NT2 per mezzo dell'Acido Retinico si ha un picco d'espressione della Nestina, filamento intermedio espresso nelle cellule proliferanti neuronali, seguito da una sua graduale diminuzione. Quando i precursori neuronali committed iniziano a uscire dal ciclo cellulare si ha l'attivazione del gene per la proteina bHLH NeuroD con un picco di espressione al decimo giorno di trattamento con RA poi seguito da una graduale down regolazione nei tempi successivi (Megiorni et al, 2005). Il pattern d'espressione appena descritto corrisponde a quello ottenuto mediante analisi quantitativa in Real Time PCR e presentato nelle figure 15.B e D (barre bianche). Negli stessi pannelli sono stati rappresentati, oltre ai campioni trattati con RA, i dati relativi ai campioni esposti al campo magnetico ELF, mostrati poi in maggior dettaglio in figura 15. A e C. Si può osservare come il campo di 29 Hz, 1 mT determini a 7-14-21 giorni, rispetto ai controlli, un aumento statisticamente significativo dell'espressione dei due marcatori Nestina e NeuroD e come l'andamento della Nestina sia molto simile a quello dei campioni trattati con Acido Retinoico (Fig. 15.D). Questo è valido fino a due settimane in quanto dopo 21 giorni di esposizione a 29 Hz, 1 mT i valori della Nestina appaiono maggiori di quelli dei trattati con RA come ad indicare un differenziamento più graduale. Al contrario in figura 15.B si osserva come nei campioni esposti al campo magnetico ELF ci sia un progressivo aumento a 7-14-21 giorni

dell'espressione di NeuroD in maniera apparentemente differente dai campioni in Acido Retinoico. In realtà i dati portano ad ipotizzare che nei campioni esposti non sia ancora stato raggiunto un picco d'espressione che è stato invece da noi riscontrato a 7 giorni nei campioni trattati con il differenziante chimico. Questi risultati lasciano pensare che l'esposizione ad un campo magnetico ELF sia in grado di indurre il differenziamento neuronale nelle NT2 espletando la sua azione in maniera più lenta ma continuativa rispetto all'Acido Retinoico che svolge invece il suo effetto legandosi a recettori specifici.

L'espressione dei marcatori tardivi NR1 e TAU nelle cellule trattate con RA corrisponde all'andamento riportato in letteratura (Andrews, 1984; Pleasure et al, 1992). Come atteso, il campo magnetico, figura 15.F e H, determina un aumento graduale dell'espressione dei geni per NR1 e TAU, con valori statisticamente maggiori rispetto ai controlli (Fig. 15.E e G) seguendo un pattern del tutto simile a quello osservato nelle NT2 in Acido Retinoico.

Per concludere i dati preliminari di questa tesi di dottorato mostrano come un agente fisico come quello da noi utilizzato possa essere in grado di indirizzare le cellule di teratocarcinoma umano NT2 verso il differenziamento neuronale in maniera alternativa al trattamento con l'Acido Retinoico. Il mio prossimo obiettivo sarà proprio quello di investigare le possibili vie e cascate del segnale attivate dall'interazione tra il campo di 29 Hz, 1 mT e le cellule NT2 ponendo particolare attenzione sul ruolo del Ca^{2+} come secondo messaggero durante il differenziamento.

REFERENZE

Adey WR. Biological effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem.* 1993 Apr;51(4):410-6.

Andrews PW. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev Biol.* 1984 Jun;103(2):285-93.

Andrews PW. Human teratocarcinomas. *Biochim. Biophys. Acta* 1988; 948: 17-36.

Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002 Apr 29;357(1420):405-17.

Andrews PW, Casper J, Damjanov I, Duggan-Keen M, Giwercman A, Hata J, von Keitz A, Looijenga LH, Millán JL, Oosterhuis JW, Pera M, Sawada M, Schmoll HJ, Skakkebaek NE, van Putten W, Stern P. Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. *Int J Cancer.* 1996 Jun 11;66(6):806-16.

Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Føgh J. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest.* 1984 Feb;50(2):147-62.

Andrews PW, Gönczöl E, Plotkin SA, Dignazio M, Oosterhuis JW. Differentiation of TERA-2 human embryonal carcinoma cells into neurons and HCMV permissive cells. Induction by agents other than retinoic acid. *Differentiation.* 1986 ;531(2):119-26.

Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans.* 2005 Dec;33(Pt 6):1526-30.

Baker KA, Hong M, Sadi D, Mendez I. Intrastratial and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2000 Apr;162(2):350-60.

Barnes PS. Effect of electromagnetic field on the rate of chemical reactions. *Biophysics* 1996, 41:801-808.

Bellomo G, Mirabelli F, Vairetti M, Iosi F, Malorni W. Cytoskeleton as a target in menadione-induced oxidative stress in cultured mammalian cells. I. Biochemical and immunocytochemical features. *J Cell Physiol.* 1990 Apr;143(1):118-28.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):517-29.

Betti E, Marchetti S, Cadossi R, Faldini A. Effect of electromagnetic field stimulation on fractures of the femoral neck. A prospective randomized double-blind study. In *Second World Congress for Electricity and Magnetism and in Biology and Medicine.* Bologna June 8-13, 1997.

Blackman CF, Benane SG, House DE, Joines WT. Effects of ELF (1-120Hz) and modulated (50Hz) RF fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro. *Bioelectromagnetics* 1985, 6:1-11.

Blackman CF, Benane SG, House DE. Frequency-dependent interference by magnetic fields of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC-12 cells. *Bioelectromagnetics.* 1995;16(6):387-95.

Blackman CF, Blanchard JP, Benane SG, House DE. Empirical test of an ion parametric resonance model for magnetic field interactions with PC-12 cells. *Bioelectromagnetics* 1994, 15:239-260.

Buonassisi V, Sato G, Cohen AI. Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962 Jul 15;48:1184-90.

Cadossi R, Bersani F, Cossarizza A, Zucchini P, Emilia G, Torelli G, Franceschi C. Lymphocytes and low-frequency electromagnetic fields. *FASEB J* 1992, 6:2667-2674.

Cameron HA, McKay RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 2001 Jul 9;435(4):406-17.

Cameron P, Mundigl O, De Camilli P. Traffic of synaptic vesicle proteins in polarized and nonpolarized cells. *J Cell Sci Suppl.* 1993;17:93-100.

Casella C, Taglietti V. *Principi di Fisiologia.* vol II. 1996. La goliardica Pavese s.r.l. Pavia.

Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.

Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH: Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 2004, 25:457-465.

Cheung WM, Fu WY, Hui WS, Ip NY. Production of human CNS neurons from embryonal carcinoma cells using a cell aggregation method. *Biotechniques*. 1999 May;26(5):946-8, 950-2, 954.

Cossarizza A, Monti D, Bersani F, Cantini M, Cadossi R, Sacchi A, Franceschi C. Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochem Biophysical Res Commun* 1989, 160:692-698.

Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U. Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995 Jan 14;84(1):109-29.

Darzynkiewicz Z: Nucleic Acid Analysis. In *Current Protocols in Cytometry*. Chapter 7. Edited by Robinson JP. New York: Wiley & Sons; Inc, 1997.

Dehmelt L, Halpain S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. 2005;6(1):204.

Dingledine R, Boland LM, Chamberlin NL, Kawasaki K, Kleckner NW, Traynelis, SF and Verdoorn TA. Amino acid receptors and uptake systems in the mammalian central nervous system. *CRC Crit. Rev. Neurobiol*. 1988; 4, 1-96.

Draper JS, Pigott C, Thomson JA, Andrews PW. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat*. 2002 Mar;200(Pt 3):249-58.

Dubinsky JM, Oxford GS. Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells. *J Gen Physiol*. 1984 Mar;83(3):309-39.

Dunnett SB, Kendall AL, Watts C, Torres EM. Neuronal cell transplantation for Parkinson's and Huntington's diseases. *Br Med Bull*. 1997;53(4):757-76.

Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant*. 2003;12(6):555-61.

Ernst C, Christie BR. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur J Neurosci*. 2005 Dec;22(12):3059-66.

Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 2000 Mar;25(3):533-5.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

Feria-Velasco A, Castillo-Medina S, Verdugo-Díaz L, Castellanos E, Orozco-Suárez S, Sánchez-Gómez C, Drucker-Colín R. Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or nerve growth factor: a histological and ultrastructural comparative study. *J Neurosci Res.* 1998 Sep 1;53(5):569-82.

Fogh J, Trempe G. (1975) in *Human Tumor Cell Lines in Vitro*, ed Fogh J. (Plenum Press, New York), pp 115–169.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):710-9.

Frey AH.. Electromagnetic field interactions with biological systems. *FASEB.* 1993 Feb; 7:272-281.

Fricker-Gates RA, Muir JA, Dunnett SB. Transplanted hNT cells ("LBS neurons") in a rat model of huntington's disease: good survival, incomplete differentiation, and limited functional recovery. *Cell Transplant.* 2004;13(2):123-36.

Fujita K, Koga Y. Clinical application of single-pulse transcranial magnetic stimulation for the treatment of depression". *Psychiatry Clin Neurosci.* 2005 Aug; 59(4):425-32.

Gaetani R, Ledda M, Barile L, Chimenti I, De Carlo F, Forte E, Ionta V, Giuliani L, D'Emilia E, Frati G, Miraldi F, Pozzi D, Messina E, Grimaldi S, Giacomello A, Lisi A. Differentiation of human adult cardiac stem cells exposed to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Cardiovasc Res.* 2009 Jun 1;82(3):411-20.

Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol.* 2008 Feb;38(2):165-9.

Gönczöl E, Andrews PW, Plotkin SA. Cytomegalovirus replicates in differentiated but not in undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Science.* 1984 Apr 13;224(4645):159-61.

Götz M, Stoykova A, Gruss P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron.* 1998 Nov;21(5):1031-44.

Gowan K, Helms AW, Hunsaker TL, Collisson T, Ebert PJ, Odom R, Johnson JE. Crossinhibitory activities of Ngn1 and Math1 allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron.* 2001 Aug 2;31(2):219-32.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985 Mar 25;260(6):3440-50.

Hartley RS, Trojanowski JQ, Lee VM. Differential effects of spinal cord gray and white matter on process outgrowth from grafted human NTERA2 neurons (NT2N, hNT). *J Comp Neurol*. 1999 Dec 20;415(3):404-18.

Herbert E, Allen RG, Paquette TL. Reversal of dexamethasone inhibition of adrenocorticotropin release in a mouse pituitary tumor cell line either by growing cells in the absence of dexamethasone or by addition of hypothalamic extract. *Endocrinology*. 1978 Jan;102(1):218-26.

Hirka G, Prakash K, Kawashima H, Plotkin SA, Andrews PW, Gönczöl E. Differentiation of human embryonal carcinoma cells induces human immunodeficiency virus permissiveness which is stimulated by human cytomegalovirus coinfection. *J Virol*. 1991 May;65(5):2732-5.

Hockfield S, McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*. 1985 Dec;5(12):3310-28.

Hollmann M and Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Ann Rev Neurosci* 1994; 17, 31-10

Jacob F. The Leeuwenhoek Lecture, 1977. Mouse teratocarcinoma and mouse embryo. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1978 May 16;201(1144):249-70.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principi di Neuroscienze*. 1994. 2^a edizione. Casa editrice Ambrosiana. Milano.

Kleinsmith LJ, Pierce GB Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res*. 1964 Oct;24:1544-51.

Kleppner SR, Robinson KA, Trojanowski JQ, Lee VM. Transplanted human neurons derived from a teratocarcinoma cell line NTera-2) mature, integrate, and survive for over 1 year in the nude mouse brain. *Comp Neurol*. 1995 Jul 10;357(4):618-32.

Korzh-Sleptsova IL, Lindstrom E, Mild KH, Berglund A, Lundgren E. Low frequency MFs increased inositol 1,4,5-trisphosphate levels in the Jurkat cell line. *FEBS Lett* 1995, 359:151-154.

Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*. 1989 Apr;2(4):1389-97.

Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R. A role for cadherins in tissue formation. *Development*. 1996 Oct;122(10):3185-94.

Layer PG, Robitzki A, Rothermel A, Willbold E. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci*. 2002 Mar;25(3):131-4.

Lednev VV. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 1991, 12:71-75.

Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:187-217.

Lester RAJ, Clements JD, Westbrook GL and Jahr CE. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 1990; 346, 565-567.

Lewis DL, Goodman MB, St John PA, Barker JL. Calcium currents and fura-2 signals in fluorescence-activated cell sorted lactotrophs and somatotrophs of rat anterior pituitary. *Endocrinology.* 1988 Jul;123(1):611-21.

Liboff AR. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells. *J Biol Phys* 1985a, 13:99-102.

Liboff AR. Cyclotron resonance in membrane transport. In *Interaction between Electromagnetic Fields and Cells*. Edited by Chiabrera A, Nicolini C, Schwan HP. London. Plenum Press; 1985b:281-296.

Liboff AR. Electric-field ion cyclotron resonance. *Bioelectromagnetics.* 1997;18:85-87.

Liboff AR. Toward an electromagnetic paradigm for biology and Medicine. *J Altern Complement Med.* 2004;10:41-47.

Liboff AR. The Ion Cyclotron Resonance Hypothesis. In *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, Bioengineering and Biophysical Aspects*. Chapter 9. 3rd edition. Edited by Barnes FS and Greenebaum B. 2007:261-292.

Liboff AR, Smith SD, McLeod BR. Experimental evidence for ion cyclotron resonance mediation of membrane transport. In *Mechanistic Approaches to Interaction of Electric and Electromagnetic Fields with Living Systems*. Edited by Blank M, Findl E. New York: Plenum Press; 1987:109-132.

Liburdy RP. Calcium signalling in lymphocytes and ELF fields: evidence for an electromagnetic field metric and a site of interaction involving calcium ion channels. *FEBS Lett* 1992, 301(1):53-59.

Lindström E, Lindström P, Berglund A, Lundgren E, Mild KH. Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics.* 1995;16(1):41-7.

Lisi A, Ciotti MT, Ledda M, Pieri M, Zona C, Mercanti D, Rieti S, Giuliani L, Grimaldi S. Exposure to 50 Hz electromagnetic radiation promote early maturation and differentiation in newborn rat cerebellar granule neurons. *J Cell Physiol.* 2005 Aug;204(2):532-8.

Lisi A, Pozzi D, Pasquali E, Rieti S, Girasole M, Cricenti A, Generosi R, Serafino AL, Congiu-Castellano A, Ravagnan G, Giuliani L, Grimaldi S. Three dimensional (3D) analysis of the morphological changes induced by 50 Hz magnetic field exposure on human lymphoblastoid cells (Raji). *Bioelectromagnetics*. 2000 Jan;21(1):46-51.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001

Lothian C, Lendahl U. An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci*. 1997 Mar;9(3):452-62.

Lozito, A. Atti seminario ASSTRA. Emissioni elettromagnetiche nel trasporto urbano collettivo, Castello di Riomaggiore, Cinque Terre, 11-12 Aprile 2002.

Ma Q, Chen Z, del Barco Barrantes I, de la Pompa JL, Anderson DJ. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron*. 1998 Mar;20(3):469-82.

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ and Barker JL. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 1986; 321, 519-522.

Manni V, Lisi A, Pozzi D, Rieti S, Serafino A, Giuliani L, Grimaldi S. Effects of extremely low frequency (50 Hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes. *Bioelectromagnetics*. 2002 May;23(4):298-305.

Manni V, Lisi A, Rieti S, Serafino A, Ledda M, Giuliani L, Sacco D, D'Emilia E, Grimaldi S. Low electromagnetic field (50 Hz) induces differentiation on primary human oral keratinocytes (HOK). *Bioelectromagnetics*. 2004 Feb;25(2):118-26.

Marchetti C, Childs GV, Brown AM. Membrane currents of identified isolated rat corticotropes and gonadotropes. *Am J Physiol*. 1987 Mar;252(3 Pt 1):E340-6.

Marchetti N, Barbieri E, Guido G, Lisanti 1988. Magnetoterapia in ortopedia. Indicazioni e risultati. Aulo Gaggi, Bologna.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-8.

Mayer ML, Westbrook GL and Guthrie PB. Voltage dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; 309, 261-263.

Mayer ML and Westbrook GL. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 1987; 394,501-527.

McCreary CR, Dixon SJ, Fraher LJ, Carson JJ, Prato FS: Real-time measurement of cytosolic free calcium concentration in Jurkat cells during ELF magnetic field exposure and evaluation of the role of cell cycle. *Bioelectromagnetics* 2006, 27(5):354-64.

McFarlane EH, Dawe GS, Marks M, Campbell IC. Changes in neurite outgrowth but not in cell division induced by low EMF exposure: influence of field strength and culture conditions on responses in rat PC12 pheochromocytoma cells. *Bioelectrochemistry*. 2000 Sep;52(1):23-8.

Megiorni F, Mora B, Indovina P, Mazzilli MC. Expression of neuronal markers during NTera2/cloned1 differentiation by cell aggregation method. *Neurosci Lett*. 2005 Jan 10;373(2):105-9.

Monaghan DT, Bridges RJ and Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1989; 29, 365-402.

Morgado-Valle C, Verdugo-Díaz L, García DE, Morales-Orozco C, Drucker-Colín R. The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res*. 1998 Feb;291(2):217-30.

Mori H and Mishina M. Review: Neurotransmitter receptors VIII, Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 1995; 34, 1219-1237.

Morris SJ, Wiegmann TB, Welling LW, Chronwall BM. Rapid simultaneous estimation of intracellular calcium and pH. In: Nuccitelli R, editor. *A practical guide to study of Ca²⁺*. *Methods Cell Biol*. 1994;40:183-220.

Morris SJ. 1993. Simultaneous multiple detection of fluorescent molecules: Rapid kinetic imaging of calcium and pH in living cells. In: Herman B, Lemasters JJ, editors. *Optical microscopy emerging methods and applications*. San Diego: Academic Press. pp 177-212.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258, 597-603.

Negulescu PA, Machen TE. Intracellular ion activities and membrane transport in parietal cells measured with fluorescent dyes. *Methods Enzymol*. 1990;192:38-81.

Nelson PT, Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Gebel J, DeCesare S, Elder EM, Zhang PJ, Jacobs A, McGrogan M, Lee VM, Trojanowski JQ. Clonal human (hNT)

neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol.* 2002 Apr;160(4):1201-6.

Newman MB, Davis CD, Borlongan CV, Emerich D, Sanberg PR. Transplantation of human umbilical cord blood cells in the repair of CNS diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Feb;4(2):121-30.

Newman MB, Davis CD, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR. Human umbilical cord blood (HUCB) cells for central nervous system repair. *Neurotox Res.* 2003;5(5):355-68.

Nikolova T, Czyz J, Rolletschek A, Blyszczuk P, Fuchs J, Jovtchev G, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J.* 2005 Oct;19(12):1686-8.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):372-6.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A and Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 1984; 307, 462-465.

Olivares-Bañuelos T, Navarro L, González A, Drucker-Colín R. Differentiation of chromaffin cells elicited by ELF MF modifies gene expression pattern. *Cell Biol Int.* 2004;28(4):273-9.

Pazur A. Characterisation of weak magnetic field effects in an aqueous glutamic acid solution by nonlinear dielectric spectroscopy and voltammetry. *Biomagn Res Technol.* 2004 Nov 30;2(1):8.

Philips MF, Muir JK, Saatman KE, Raghupathi R, Lee VM, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Survival and integration of transplanted postmitotic human neurons following experimental brain injury in immunocompetent rats. *J Neurosurg.* 1999 Jan;90(1):116-24.

Piacentini R, Ripoli C, Mezzogori D, Azzena GB, Grassi C. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote in vitro neurogenesis via upregulation of Ca(v)1-channel activity. *J Cell Physiol.* 2008 Apr;215(1):129-39.

Pierce B, Verney EL, Dixon FJ. The biology of testicular cancer. I. Behavior after transplantation. *Cancer Res.* 1957 Feb;17(2):134-8.

Pleasure SJ, Page C, Lee VM. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J Neurosci.* 1992 May;12(5):1802-15.

Quatacker J, Partoens P, De Potter W. Differential ultrastructural distribution of synapsin and synaptophysin proximal to a ligation in bovine splenic nerve. *Brain Res.* 1998 Aug 17;802(1-2):281-4.

Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD. Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*. 2003 Jul 3;39(1):13-25.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000 Aug;164(2):247-56.

Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res*. 2002 Sep 15;69(6):880-93.

Santoro N, Lisi A, Pozzi D, Pasquali E, Serafino A, Grimaldi S. Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji). *Biochim Biophys Acta*. 1997 Jul 24;1357(3):281-90.

Seeburg PH. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 1993;16, 359-365.

Serway RA. 1998. Copyright ©. *Principi di fisica*. (Saunders College Publishing).

Shapiro HM: *Practical Flow Cytometry*. 2nd edition. New York: Liss AR Inc; 1988.

Simeone A, Acampora D, Arcioni L, Andrews PW, Boncinelli E, Mavilio F. Sequential activation of HOX2 homeobox genes by retinoic acid in human embryonal carcinoma cells. *Nature* 1990 Aug 23;346(6286):763-6.

Smith SC, Reuhl KR, Craig J, McBurney MW. The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation. *J Cell Physiol*. 1987 Apr;131(1):74-84.

Sommer L, Ma Q, Anderson DJ. neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci*. 1996;8(4):221-41.

Stanke M, Stubbusch J, Rohrer H. Interaction of Mash1 and Phox2b in sympathetic neuron development. *Mol Cell Neurosci*. 2004 Mar;25(3):374-82.

Stilley CS, Ryan CM, Kondziolka D, Bender A, DeCesare S, Wechsler L. Changes in cognitive function after neuronal cell transplantation for basal ganglia stroke. *Neurology*. 2004 Oct 12;63(7):1320-2.

Stutzin A, Stojilković SS, Catt KJ, Rojas E. Characteristics of two types of calcium channels in rat pituitary gonadotrophs. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 1):C865-74.

Taylor JP, Sater R, French J, Baltuch G, Crino PB. Transcription of intermediate filament genes is enhanced in focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol*. 2001 Aug;102(2):141-8.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Tooze J, Hollinshead M, Fuller SD, Tooze SA, Huttner WB. Morphological and biochemical evidence showing neuronal properties in AtT-20 cells and their growth cones. *Eur J Cell Biol*. 1989 Aug;49(2):259-73.

Trojanowski JQ, Mantione JR, Lee JH, Seid DP, You T, Inge LJ, Lee VM. Neurons derived from a human teratocarcinoma cell line establish molecular and structural polarity following transplantation into the rodent brain. *Exp Neurol*. 1993 Aug;122(2):283-94.

Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:715-60).

Upton AC, Furth J. Induction of pituitary tumors by means of ionizing irradiation. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953 Oct;84(1):255-7.

Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Mesirca P, Remondini D, Bersani F: Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields. *FASEB J* 2004, 19:155-157.

Walleczek J: Electro-magnetic field effect on cells of the immune system: the role of calcium signalling. *FASEB J* 1992, 6:3177-3185.

Wiegmann TB, Welling LW, Beatty DM, Howard DE, Vamos S, Morris SJ. Simultaneous imaging of intracellular $[Ca^{2+}]$ and pH in single MDCK and glomerular epithelial cells. *Am J Physiol*. 1993 Oct;265(4 Pt 1):C1184-90.

Willing AE, Vendrame M, Mallery J, Cassady CJ, Davis CD, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. *Cell Transplant*. 2003;12(4):449-54.

Yasamura Y, Tashjian AH Jr, Sato GH. Establishment of four functional, clonal strains of animal cells in culture. *Science*. 1966 Dec 2;154(753):1186-9.