

# *In-vitro* analysis of Quantum Molecular Resonance effects on human mesenchymal stromal cells

Sabrina Sella<sup>1</sup>, Valentina Adami<sup>2</sup>, Eliana Amati<sup>1</sup>, Martina Bernardi<sup>1,3</sup>, Katja Chieragato<sup>1,3</sup>, Pamela Gatto<sup>2</sup>, Martina Menarin<sup>1</sup>, Alessandro Pozzato<sup>4</sup>, Gianantonio Pozzato<sup>4</sup>, Giuseppe Astori<sup>1</sup>\*

**1** Laboratorio di Terapia Cellulare Avanzata, Unità di Ematologia, Ospedale di Vicenza, Vicenza, Italia, **2** Core Facility Screening High Throughput, Centro di Biologia Integrativa, Università di Trento, Trento, Italia, **3** Fondazione Progetto Ematologia, Vicenza, Italia, **4** Telea Electronic Engineering srl, Sandrigo, Italia

\* [astori@hemato.ven.it](mailto:astori@hemato.ven.it)

## Abstract

I campi elettromagnetici svolgono un ruolo essenziale nelle funzioni cellulari che interferiscono con i percorsi cellulari e la fisiologia dei tessuti. In questo contesto, la Risonanza Quantica Molecolare (QMR) produce onde con una forma specifica ad alte frequenze (4-64 MHz) e bassa intensità attraverso i campi elettrici. Abbiamo valutato gli effetti della stimolazione QMR su cellule stromali mesenchimali derivate dal midollo osseo (MSC). Le MSC sono state trattate con QMR per 10 minuti per 4 giorni consecutivi per 2 settimane con diverse potenze nominali. Sono stati studiati la morfologia cellulare, il fenotipo, la differenziazione multilineare, la vitalità e la proliferazione. Gli effetti QMR sono stati ulteriormente studiati dal microarray cDNA convalidato mediante PCR in tempo reale. Dopo 1 e 2 settimane di trattamento QMR, si sono mantenuti morfologia, fenotipo e differenziazione multilineare e non sono state osservate alterazioni della vitalità cellulare e della proliferazione tra i campioni e i controlli MSC trattati. L'analisi del microarray cDNA ha evidenziato più cambiamenti trascrizionali sulle cellule trattate con una potenza nominale di 40 rispetto a quelle con 80. I principali elenchi di arricchimento appartenevano ai processi di sviluppo, alla regolazione della fosforilazione, alla regolazione delle vie cellulari incluso il metabolismo, l'attività della chinasi e l'organizzazione cellulare. La PCR in tempo reale ha confermato un aumento significativo dell'espressione dei geni MMP1, PLAT e ARHGAP22, mentre il gene A2M ha mostrato una ridotta espressione nelle cellule trattate rispetto ai controlli. È interessante notare che i geni MMP1, PLAT e A2M differenzialmente regolati sono coinvolti nel rimodellamento della matrice extracellulare (ECM) attraverso il sistema fibrinolitico implicato anche nell'embriogenesi, nella cicatrizzazione delle ferite e nell'angiogenesi. Nel nostro modello, la MSC trattata con QMR ha mantenuto inalterato il fenotipo delle cellule, la vitalità, la proliferazione e la capacità di differenziare in osso, cartilagine e tessuto adiposo. L'analisi dei microarray può suggerire un coinvolgimento del trattamento QMR nell'angiogenesi e nella rigenerazione tissutale, probabilmente attraverso il rimodellamento dell'ECM.

## Introduzione

Le cellule interagiscono con l'ambiente circostante attraverso i recettori e i canali ionici che trasmettono segnali chimici, meccanici ed elettrici. In questo contesto, i campi elettromagnetici (EMF) interferiscono con le vie cellulari e la fisiologia dei tessuti [1]. L'interazione cellula-EMF può avvenire attraverso molecole e proteine cariche nella membrana cellulare che altera il flusso di ioni o riorganizza la distribuzione dei recettori di membrana, o attraverso la penetrazione diretta del campo all'interno della cellula [2].

Vi sono prove che la manipolazione dell'ambiente elettromagnetico su sistemi biologici favorisce il processo di guarigione della ferita, la riduzione dello stato infiammatorio, l'angiogenesi e la sintesi della matrice extracellulare (ECM) [3]. Di fatto, i campi elettromagnetici regolano una varietà di funzioni cellulari, inclusa promozione e inibizione della proliferazione cellulare [4, 5], vitalità cellulare [6, 7], differenziazione [8-10], migrazione cellulare e motilità [11-13], risposta infiammatoria [14, 15] e profili di espressione genica [16, 17]. Di conseguenza, l'applicazione terapeutica di campi elettromagnetici è oggetto di crescente interesse per la medicina. Al contrario, i meccanismi di azione dei campi elettromagnetici nei tessuti biologici sono solo parzialmente noti [18].

La Risonanza Quantica Molecolare (QMR) è una tecnologia già applicata per scopi chirurgici e medici. La QMR crea quanti di energia in grado di rompere i legami molecolari senza aumentare l'energia cinetica delle molecole colpite, quindi senza innalzare la temperatura e limitare il danno al tessuto circostante. La tecnologia QMR sfrutta onde ad alta frequenza non ionizzanti nell'intervallo compreso tra 4 e 64 MHz a bassa intensità erogata attraverso campi elettrici alternati. L'effetto della stimolazione QMR si basa sull'induzione di più frequenze allo stesso tempo, dove l'onda fondamentale è a 4 MHz e quelle successive aumentano il contenuto armonico fino a 64 MHz con ampiezze decrescenti correlate.

La QMR trova applicazione clinica nei coagulanti bipolari o nei dispositivi di elettrochirurgia [19, 20]. Per questo tipo di applicazioni, il generatore di risonanza molecolare lavora sulla combinazione di quattro frequenze nel range di 4-16 MHz. Il primo studio sperimentale che testava gli effetti QMR descriveva in un modello di toracotomia su ratto un danno tissutale meno grave rispetto all'elettrocauterio standard [21].

Fino ad oggi sono disponibili pochi dati sul meccanismo di interazione tra QMR e cellule. Dal Maschio e colleghi [22] hanno fornito la descrizione del comportamento delle fibre muscolari esposte a QMR, dove i cambiamenti del potenziale di membrana e le variazioni della concentrazione di calcio libero seguivano rigorosamente il decorso temporale dell'applicazione e della rimozione del campo elettrico. Inoltre, è stata riportata l'efficacia della Risonanza Quantica Molecolare nel ridurre l'edema dopo l'artroplastica totale del ginocchio in uno studio clinico [23].

Il nostro lavoro mirava a comprendere come la QMR agisce sulle cellule mesenchimali stromali (MSC) derivate dal midollo osseo umano.

L'uso di MSC per la cicatrizzazione dei tessuti e nella medicina rigenerativa è stato esteso nell'ultimo decennio [24], ma la ricerca attuale sulle MSC mira non solo allo sviluppo di protocolli clinici di terapia cellulare o di medicina rigenerativa, ma anche a fornire modelli sperimentali in grado di informare su meccanismi molecolari come l'infiammazione, l'angiogenesi e l'apoptosi [25].

Tre criteri principali sono stati proposti dall'International Society for Cellular Therapy (ISCT) per la definizione di MSC [26]: aderenza alla plastica in condizioni di coltura standard; espressione di CD105, CD73, CD90 e mancanza di espressione di HLA-DR, insieme alla mancanza di ematopoimarcatori di superficie etici ed endoteliali CD14, CD45, CD34, CD11b e CD31 [27]; *in Vitro* potenziale di differenziazione in osteociti, condrociti e adipociti in condizioni di coltura appropriate [28]. Nonostante i tentativi di stabilire criteri minimi generalmente accettabili per definire la MSC umana mediante immunofenotipizzazione, la capacità funzionale di differenziarsi lungo i classici percorsi mesodermici a tre linee rimangono una caratteristica fondamentale di questo tipo di cellule.

Le MSC rappresentano un modello ideale per studiare gli effetti dell'EMF ad alta frequenza e della corrente elettrica. Le MSC mostrano una notevole plasticità data la capacità di transdifferenziare o subire una rapida alterazione del fenotipo, dando origine così alle cellule che possiedono le caratteristiche di diversi lignaggi. Inoltre, vi sono prove che la MSC derivata dal midollo osseo endogeno potrebbe essere reclutata e mobilizzata in siti di lesioni [29]. Di conseguenza, la MSC può essere utilizzata in varie patologie cliniche in cui è necessaria la riparazione del tessuto o in cui si ritiene che queste cellule agiscano attraverso le loro attività antinfiammatorie e immunomodulatorie.

Nel presente studio, abbiamo utilizzato un ampio approccio di valutazione per studiare gli effetti della QMR sulla MSC umana a diversi livelli di indagine. Le colture cellulari sono state esposte a diverse impostazioni QMR e ai tempi di trattamento. Abbiamo valutato il mantenimento dell'identità MSC e quindi abbiamo eseguito test di vitalità e proliferazione cellulare per valutare ulteriori informazioni. Infine, abbiamo studiato il profilo trascrizionale della MSC dopo la stimolazione QMR.

## Materiali e metodi

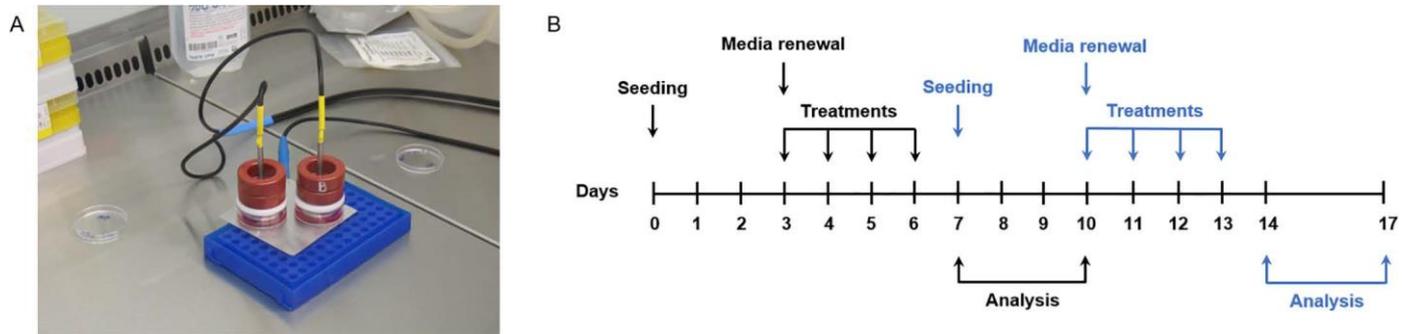
### Isolamento MSC ed espansione *ex-vivo*

Le MSC sono state isolate dalle cellule ottenute attraverso i lavaggi da sacche di raccolta del midollo scartato e filtri di donatori sani, 2 maschi e 4 femmine (età media: 34,5 anni. Intervallo 23-47). Dopo due fasi di lavaggio con 200 ml di soluzione salina e centrifugazione a 2.000 rpm per 10 minuti, le cellule nucleate raccolte sono state seminate in toto alla densità di  $1 \times 10^5$  cellule/cm<sup>2</sup> in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con GlutaMAX™ e piruvato (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) integrato con siero bovino fetale al 10% (FBS, Qualified Australian, Gibco, Thermo Fisher Scientific) e penicillina/streptomina all'1% (P/S, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Le colture sono state incubate a 37 °C in un'atmosfera umidificata con il 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule non aderenti sono state rimosse dopo 72 ore e il mezzo fresco è stato aggiunto, quindi il terreno di coltura è stato cambiato ogni 3-4 giorni. Con una confluenza dell'80%, le MSC sono state lavate con soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (D-PBS, Sigma-Aldrich), raccolte usando 10X TrypLE Select (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e subcoltivate a una densità di 1.500 cellule/cm<sup>2</sup>. Le colture sono state osservate con un microscopio a luce invertita Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) e le immagini sono state acquisite utilizzando un sistema di telecamere Mrm Axio-Cam (Carl Zeiss).

### Modello cellulare e protocollo di stimolazione QMR

Le colture MSC sono state esposte a QMR utilizzando un generatore di QMR sperimentale fornito da Telea (Telea Electronic Engineering, Sandrigo, VI, Italia). L'impostazione del generatore QMR era la seguente: alimentazione: 230 V ~ 50/60 Hz; potenza massima in ingresso: 250 VA; potenza in uscita: 45 W / 400 Ω. Il prototipo ha potenziato le correnti elettriche alternate caratterizzate da onde ad alta frequenza e bassa intensità. L'onda fondamentale era a 4 MHz e quelle successive hanno aumentato il contenuto armonico fino a 64 MHz con ampiezze decrescenti correlate. Le stimolazioni sono state erogate attraverso l'innalzamento delle potenze effettive in uscita (4-45 W) corrispondenti all'aumento di valore delle potenze nominali utilizzate come impostazioni QMR.

Il modello cellulare e il sistema di erogazione QMR erano composti da una coppia di elettrodi sferoidali su misura (anodi) di 35 mm di diametro e da un elettrodo (catodo) costituito da una piastra metallica. Gli elettrodi sono stati posti all'interno di due piastre di Petri e supportati da un componente di polivinilcloruro per consentire il contatto diretto dell'elettrodo con la superficie del mezzo di coltura. Il catodo era posizionato sotto le piastre di Petri ([Fig. 1A](#)).



**Fig 1. Protocollo di stimolazione QMR.** A) Immagine del sistema di esposizione. B) Schema del trattamento QMR. Le cellule sono state seminate il giorno 0, raccolte e riseminate il 7° giorno. Il primo ciclo di trattamento è iniziato dopo il rinnovo dei mezzi il terzo giorno (freccie nere) e il secondo il giorno 10 (freccie blu). Le culture sono state stimolate 10 minuti/giorno per 4 giorni consecutivi con 40 o 80 potenze nominali. I controlli esposti a simulazione erano tenuti in parallelo.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g001>

L'allestimento sperimentale è stato progettato per riprodurre in-vitro le condizioni terapeutiche in termini di tempi e potenze. Sulla base di referti medici e di una lunga esperienza aziendale, sono state selezionate le impostazioni più efficaci con follow-up positivo per la sperimentazione di culture MSC.

Le MSC ai passaggi 4-6 sono state seminate in piastre Petri da 35 mm di diametro in duplicato per condizione (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria) e dopo 72 ore dalla semina iniziale, è stato modificato il terreno completo. Le cellule sono state sottoposte a 10 minuti/giorno di stimolazione QMR per 4 giorni consecutivi con un periodo di pausa di 24 ore tra di loro. Le stesse culture MSC esposte al primo ciclo di trattamento QMR sono state riseminate per il secondo e trattate in condizioni identiche (Fig. 1B). Sono state applicate due diverse impostazioni QMR corrispondenti a 40 e 80 potenze nominali. I controlli erano tenuti in parallelo come controlli esposti a simulazione con presenza di elettrodi nel mezzo cellulare e senza esposizione QMR.

### Caratterizzazione del fenotipo MSC

Il fenotipo MSC era caratterizzato da citometria a flusso prima e dopo la stimolazione QMR. In breve,  $1 \times 10^5$  le cellule sono state incubate con i seguenti anticorpi monoclonali: CD90-FITC, CD105-PE, CD45-ECD, HLA-DR-APC (tutti acquistati da Beckman Coulter, Brea, CA, USA) e CD73-PC7 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) per 15 minuti a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Sono stati acquisiti almeno 20.000 eventi su un citometria a flusso CYTOMICS FC500 e i dati sono stati analizzati dal software Kaluza (entrambi Beckman Coulter). L'espressione di ciascun marcatore è stata valutata come percentuale (%) di cellule positive e come intensità di fluorescenza mediana relativa (rMFI), quest'ultima definita come il rapporto tra l'intensità di fluorescenza mediana del marcatore e il suo controllo specifico negativo.

### Differenziazione multilineare

Dopo due cicli di stimolazioni consecutive è stato testato il potenziale di differenziazione MSC. I campioni sono stati raccolti e riseminati in piastre da 24 pozzetti (Falcon, Corning Life Sciences, NY, USA) in presenza di coprivetrino circolari con diametro di 13 mm e spessore di 0,2 mm (Nunc, Thermo Fisher Scientific) alla densità di 4.000 cellule/cm<sup>2</sup>. La differenziazione è stata indotta in semi-confluenza con mezzi di differenziazione specifici per 21 giorni con kit di adipogenesi, osteogenesi e condrogenesi StemPro (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Il mezzo fresco è stato aggiunto ogni 3 giorni e i rispettivi controlli sono stati mantenuti in parallelo con il mezzo di espansione standard.

Per rilevare la formazione di goccioline lipidiche, le cellule sono state fissate in formalina al 10% per 5 minuti e colorate con Oil Red O (Diapath, Martinengo, BG, Italia) in base alle istruzioni del produttore.

La presenza di deposito di calcio come espressione di induzione osteogenica è stata analizzata con colorazione rossa di alizarina. I campioni sono stati lavati con D-PBS e fissati in etanolo ghiacciato al 70% a 4° C per 1 ora. Quindi, sono stati incubati per 15 minuti con 0,02 g/ml di soluzione rossa di alizarina (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. Infine, sono stati eseguiti diversi lavaggi con acqua deionizzata.

Per verificare la differenziazione condrogenica, le cellule sono state fissate in formalina al 10% per 5 minuti e colorate con 1 g/l in HCl 0,1 M di alcian blu per 2 ore a temperatura ambiente. Al termine della colorazione specifica per i polisaccaridi acidi, i coprivetrino sono stati risciacquati abbondantemente con acqua deionizzata.

Dopo ogni colorazione, i coprivetrino sono stati montati su vetrini per microscopio usando gelatina di glicerolo di Kaiser preriscaldata a 37 °C. L'acquisizione di immagini è stata ottenuta mediante sistema di telecamere AxioCam Erc

5s (Carl Zeiss).

### **Valutazione della vitalità cellulare**

La vitalità cellulare è stata determinata mediante citometria a flusso utilizzando il kit di colorazione LIVE/DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific) secondo le istruzioni del produttore mediante l'acquisizione di campioni su un citometro CyTOMICS FC500. I dati sono stati analizzati come % di cellule positive pallide o luminose mediante software Kaluza (Beckman Coulter).

### **Quantificazione della proliferazione cellulare**

La proliferazione cellulare è stata determinata mediante saggio WST-1 (Sigma Aldrich). Al termine di due cicli consecutivi di trattamento QMR, le cellule sono state raccolte e seminate in 96 pozzetti (Falcon, Corning Life Sciences) alla densità di 2.000 cellule/pozzetto. Dopo 72 ore è stato aggiunto WST-1 e incubato per 3 ore a 37 ° C. Infine, le piastre sono state lette a 450 nm con uno spettrofotometro (SpectraCount, Packard Instrument Company Inc, Meriden, CT, USA). I dati sono stati espressi come percentuale (%) di proliferazione sul controllo.

### **Analisi su microarray di cDNA**

L'RNA derivato da cinque diversi campioni di MSC esposti a un ciclo di stimolazione QMR e i corrispondenti controlli MSC sono stati estratti utilizzando il mini kit RNeasy plus (Qiagen, Hilden, Germania) in base alle istruzioni del produttore. La quantificazione totale dell'RNA è stata ottenuta con lo spettrofotometro UV-VIS NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). La qualità dell'RNA è stata determinata utilizzando il sistema Bioanalyzer Agilent 2100 con kit Eukaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). I campioni sono stati elaborati in base al protocollo "Analisi di espressione genica basata su microarray a un colore di Agilent (etichettatura dell'amplificatore rapido a basso ingresso)" con kit di microarray Human GE 4x44K V2 (Agilent Technologies).

I vetrini di microarray sono stati rilevati con lo scanner Agilent tramite il software ScanControl. I dati grezzi delle immagini di microarray sono stati estratti dal software Agilent Feature Extraction. Successivamente i dati sono stati sottoposti a una fase di pre-elaborazione utilizzando il programma open source Bioconductor che utilizza il pacchetto Limma con linguaggio R [30].

### **PCR quantitativa in tempo reale**

Le colture MSC sono state esposte o meno a QMR a 40 potenza nominale per un ciclo e l'RNA totale è stato estratto utilizzando il Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore. La qualità e la quantità sono state determinate utilizzando lo spettrofotometro UV-VIS Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 800 ng di RNA totale, utilizzando il kit di sintesi del cDNA di iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in base alle istruzioni del produttore.

Il cDNA ottenuto è stato diluito a 1:10 e gli esperimenti quantitativi di PCR in tempo reale sono stati eseguiti utilizzando SsoFast EvaGreen Supermix con Low Rox (Bio-RAD) sul sistema PCR Real-Time ABI 7500 (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific). I primer utilizzati per l'amplificazione sono stati convalidati e acquistati da Bio-RAD. Il protocollo consisteva di 30 secondi a 95 °C, 40 cicli di 5 secondi a 95 °C e una fase di allungamento di 32 secondi a 60 °C, seguita da una fase di fusione finale per valutare la qualità del prodotto. Ogni gene è stato testato in tre repliche e sono stati eseguiti sei esperimenti indipendenti. L'acquisizione dei dati è stata ottenuta tramite il software SDS v1.2 (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) e l'espressione relativa è stata determinata utilizzando il metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [31] con TBP e YWHAZ come geni di riferimento.

### **Analisi statistica**

Per analizzare le differenze tra le impostazioni sperimentali e i controlli esposti con simulazione dopo entrambi i cicli QMR, i dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via seguita dal test post-hoc di confronto multiplo di Dunnett.

Sono stati analizzati i dati quantitativi in tempo reale della PCR mediante test t abbinato confrontando i valori  $\Delta Ct$ . L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando GraphPad Prism versione 5.01 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Le differenze tra i campioni sono state considerate statisticamente significative a  $p < 0,05$ .

Per l'analisi del microarray cDNA, i geni differenzialmente espressi (DEG) tra cellule (40 o 80 potenza nominale) e cellule di controllo sono stati elaborati utilizzando il pacchetto Limma con il metodo empirico di Bayes, tenendo conto

della provenienza dei lotti (test appaiato). Le differenze tra le condizioni (cellule trattate e cellule di controllo) sono state considerate significative dopo la correzione di Benjamini e Hochberg a  $p < 0,05$ . Per analizzare il miglior arricchimento delle liste di geni, sono stati applicati gli strumenti di calcolo ToppGene Suite e Ingenuity Pathway Analysis (IPA). È stato considerato un valore  $q < 0,01$  con la correzione di FJ (false discovery rate) di Benjamini e Hochberg per ToppGene Suite e un valore  $p < 0,01$  con correzione Bonferroni-Hochberg per analisi IPA.

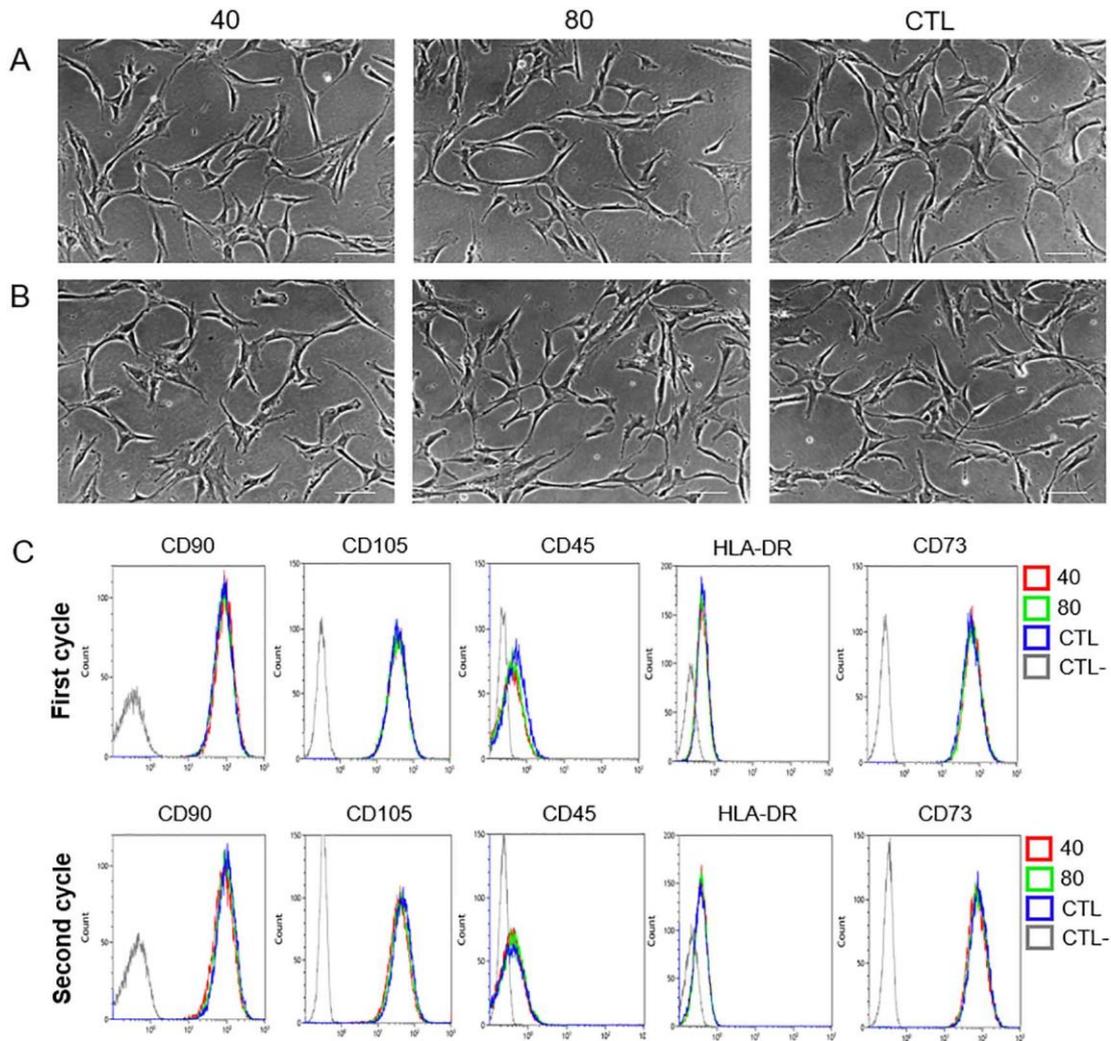
## Risultati

### Valutazione dell'identità MSC dopo la stimolazione QMR

Al fine di valutare la modifica dell'identità MSC dopo il primo e il secondo ciclo di trattamento con QMR, abbiamo analizzato la morfologia, l'espressione di marcatori di superficie e il potenziale di multi-differenziazione. La morfologia della MSC è stata osservata ogni giorno prima e dopo i trattamenti QMR nelle diverse impostazioni. Le cellule hanno conservato il loro aspetto canonico a forma di fuso fibroblasto-simile durante tutto il tempo degli esperimenti ([Fig 2A e 2B](#)). L'espressione fenotipica tipica di MSC di CD90, CD105 e CD73 era costante  $>95\%$ , mentre quella di CD45 e HLA-DR costantemente inferiore al 2% ([Fig 2C](#)). Inoltre, ogni marcatore ha mostrato un rMFI di espressione simile senza significatività statistica tra campioni trattati e non trattati nelle diverse impostazioni ([S2 Fig](#)). Per analizzare se le colture cellulari avessero perso il potenziale di differenziazione mesenchimale *in vitro* dopo due cicli di stimolazione QMR, abbiamo indotto le cellule a differenziarsi in linee osteogeniche, adipogeniche e condrogeniche utilizzando i componenti e le condizioni dei mezzi definiti ([Fig 3](#)). I campioni di MSC trattati con QMR e con esposizione simulata sono stati in grado di differenziarsi dopo 21 giorni di induzione, essendo positivi alla colorazione specifica di Alizarina Red, Oil Red O e Alcian blu per osteogenesi ([Fig 3A e 3B](#)), adipogenesi ([Fig 3C e 3D](#)) e condrogenesi ([Fig 3E e 3F](#)), rispettivamente. Non sono state osservate differenze qualitative tra i vari trattamenti e controlli QMR a questo livello. Risultati simili sono stati rilevati tra uno ([Fig 3A, 3C e 3E](#)) e due cicli ([Fig 3B, 3D e 3F](#)) di stimolazione.

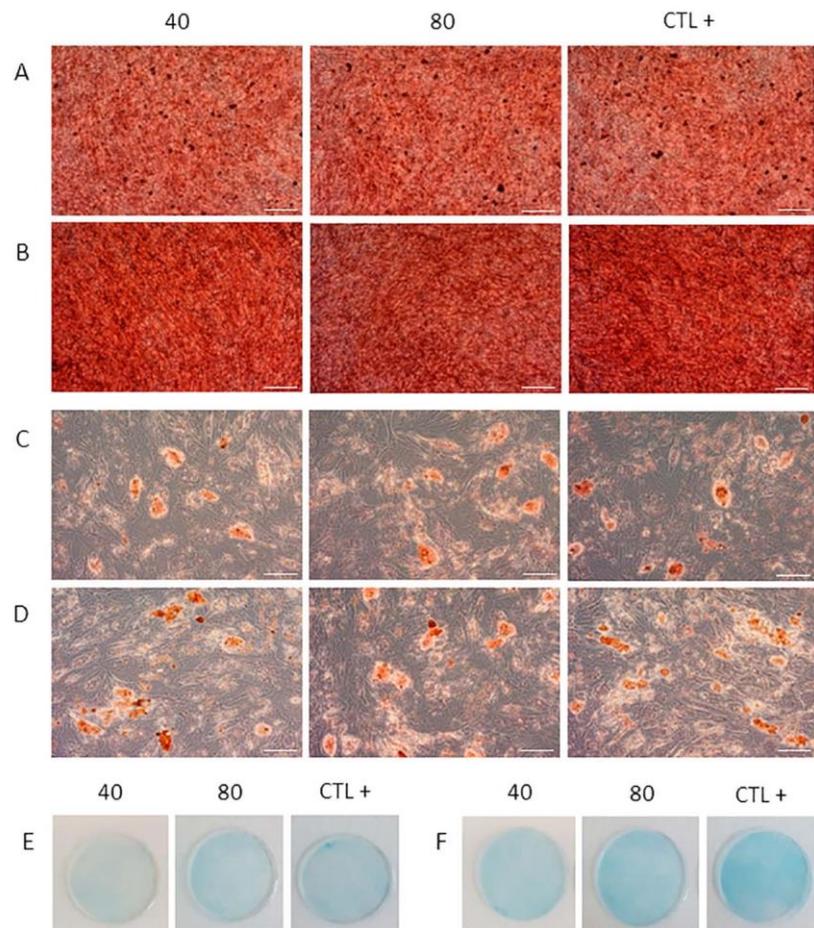
**Figura 2. Morfologia MSC e analisi di citometria a flusso dopo stimolazione QMR.** A) Le immagini sono state ottenute dopo 10 minuti di stimolazione QMR al giorno 5 (primo ciclo di trattamento) e al B) giorno 12 (secondo ciclo di trattamento). Barra della scala = 100  $\mu$ m. Ingrandimento totale = 100X. È stato mostrato un esperimento rappresentativo. C) È stata utilizzata una combinazione di cinque colori di anticorpi monoclonali per verificare l'identità della MSC secondo i marcatori di superficie sopra elencati di un campione rappresentativo. Linea grigia = controllo non macchiato (CTL-). Linea blu = controllo esposto a simulazione (CTL). Linea verde = impostazione QMR 80. Linea rossa = impostazione QMR 40.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g002>



### Vitalità e proliferazione delle MSC dopo la stimolazione QMR

La vitalità cellulare è stata quantificata mediante citometria a flusso alla fine di ogni ciclo (Fig 4A). La vitalità non è stata influenzata dalla QMR; infatti, oltre il 95% delle cellule era vivo in modo simile ai controlli, con una bassa variabilità tra diversi lotti e impostazioni MSC. Questi risultati hanno confermato le osservazioni morfologiche. La proliferazione di MSC non è stata influenzata dalla QMR che non mostrava differenze significative tra controlli e campioni trattati con QMR a diverse impostazioni e tempi (Fig 4B).



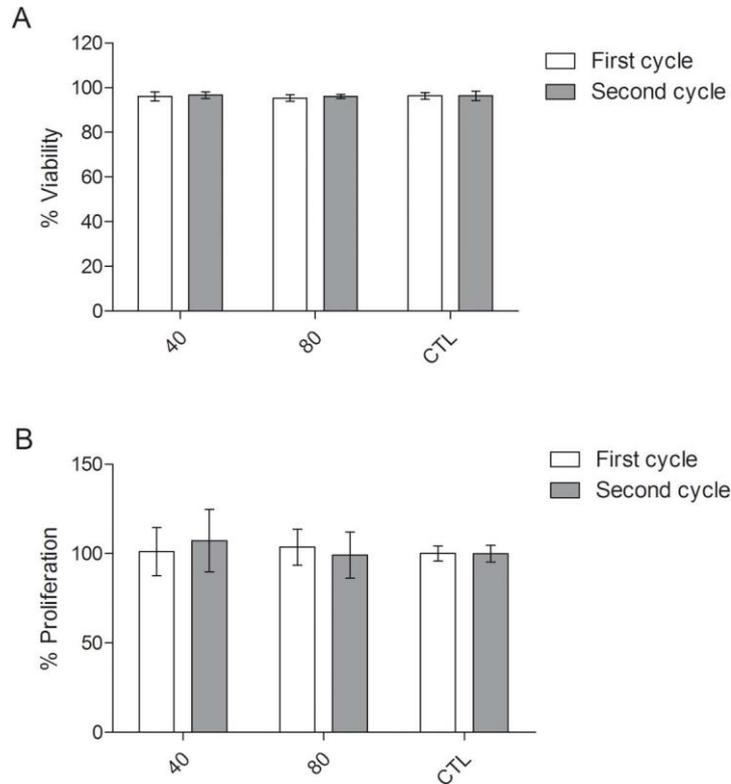
**Fig 3. Differenziazione adipogenica, osteogenica e condrogenica dopo cicli di stimolazione QMR.** I pannelli mostrano un esperimento rappresentativo che illustra il risultato finale nella differenziazione multilineare MSC dopo 21 giorni di induzione. Il trattamento con QMR (a 40 e 80 potenze nominali) e i campioni non trattati (CTL +) sono stati indotti alla differenziazione. La differenziazione osteogenica dopo un ciclo (A) e due cicli (B) di stimolazione QMR è stata valutata utilizzando Alizarin Red. Differenziazione adipogenica (C, D) e condrogenica (E, F) sono state rilevate, rispettivamente, tramite colorazioni Oil Red O e Alcian Blue. Barra della scala = 100  $\mu$ m. Ingrandimento totale = 100x.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g003>

### Analisi dell'espressione genica mediante microarray dopo il trattamento QMR

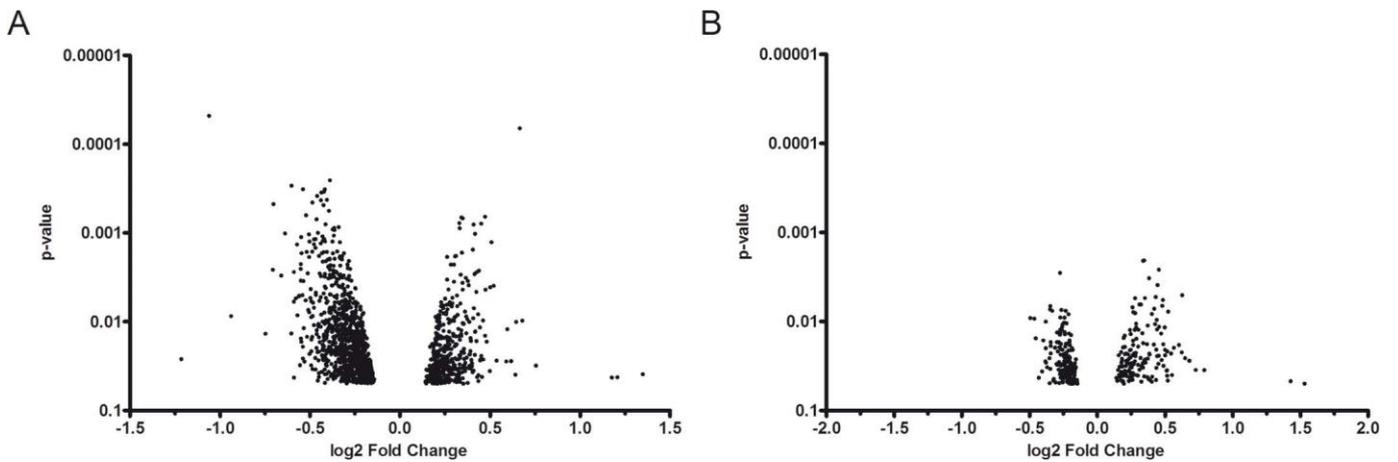
Sulla base dei risultati precedenti, abbiamo studiato l'effetto di QMR su MSC a livello trascrizionale eseguendo esperimenti su microarray di cDNA dopo un ciclo di trattamento (giorno 7). La fase di pre-elaborazione dei dati del microarray cDNA ha ridotto il numero iniziale di trascrizioni da 28.000 a circa 12.600. Successivamente, i campioni sono stati raggruppati in base alla similarità dei profili di espressione genica (doi: [10.6084/m9.figshare.5702137](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.5702137)). Non sorprendentemente, i risultati del clustering hanno mostrato che i campioni si raggruppavano principalmente in base alla provenienza del donatore e non ai trattamenti QMR, come risultato della variabilità biologica intrinseca tra i lotti MSC analizzati.

L'analisi DEG è stata applicata per identificare le differenze tra campioni di MSC trattati con QMR ed esposti a simulazione. Tre dei 16 campioni (15 campioni + 1 replica tecnica) non hanno soddisfatto i criteri di controllo di qualità e pertanto sono stati scartati dall'analisi successiva. Sono stati identificati più cambiamenti trascrizionali per potenza nominale 40 rispetto a 80. Secondo un p-value corretto per cut-off < 0,05, sono stati rilevati 411 geni sovraregolati e 987 sottoregolati quando si utilizzava 40 come potenza nominale (Fig 5A). Alla potenza nominale di 80, sono stati rilevati 163 geni sovraregolati e 199 sottoregolati (Fig 5B). In entrambi i casi, la maggior parte dei DEG mostrava un cambiamento multiplo molto basso.



**Fig 4. Vitalità cellulare e proliferazione dopo il trattamento QMR.** A) Gli istogrammi rappresentano la percentuale di vitalità cellulare dopo due cicli di trattamento QMR nelle diverse impostazioni rispetto ai controlli esposti tramite simulazione determinati dalla citometria a flusso. I dati sono stati mostrati come media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti; B) Le percentuali di proliferazione cellulare sui controlli sono state ottenute con il saggio WST-1 dopo 72 ore. I dati sono stati rappresentati come media  $\pm$  DS di n = 6 esperimenti indipendenti. Nessuna differenza statistica è stata trovata tra le condizioni.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g004>



**Fig 5. Dot plot di geni differenzialmente espressi associati al trattamento QMR a potenze nominali 40 e 80.** Le immagini illustravano la distribuzione di geni sovraregolati e sottoregolati a (A) 40 e (B) 80 (correzione di Benjamini e Hochberg in  $p < 0,05$ ). I risultati sono stati valutati confrontando la MSC trattata con QMR (dopo un ciclo di QMR a potenze nominali di 40 e 80) con colture di controllo non trattate. L'asse y era in scala log10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g005>

Per studiare i processi biologici e le biofunzioni in risposta alla stimolazione QMR, l'analisi di arricchimento genico è stata eseguita utilizzando ToppGene Suite e gli strumenti IPA (Fig 6). I principali processi biologici regolati da potenza nominale 40 erano legati allo sviluppo cellulare e tissutale, alla differenziazione cellulare e allo sviluppo del sistema vascolare (Fig 6A e 6C). Regolazione positiva della fosforilazione delle proteine, trasporto mediato da vescicole, regolazione positiva dei processi metabolici (Fig 6A), morfologia cellulare e biofunzioni di interazione cellula-cellula (Fig 6C) sono stati trovati sottoregolati dalla stimolazione QMR. La proliferazione cellulare e i processi di movimento sono ugualmente significativamente arricchiti in entrambi i dataset genetici. Il trattamento con potenza nominale 80 ha mostrato un arricchimento di geni sovraregolati in relazione all'organizzazione della matrice extracellulare e geni sottoregolati corrispondenti alla proteolisi del dominio intracellulare della proteina di membrana. Questi ultimi sono stati identificati utilizzando ToppGene Suite perché IPA non ha evidenziato elenchi di arricchimento rilevanti (S1 Fig).

### Valutazione dell'espressione genica dopo 40 stimoli QMR in PCR quantitativa in tempo reale

Per confermare la modulazione dell'espressione genica rivelata dall'analisi del microarray del cDNA, è stata effettuata una PCR quantitativa in tempo reale in colture MSC trattate con potenza nominale 40 per un ciclo QMR. Come illustrato nella Tabella 1 i geni erano coinvolti in percorsi correlati allo sviluppo cellulare e tissutale, come il rimodellamento dell'ECM, l'angiogenesi, la migrazione cellulare e la regolazione dei filamenti di actina. I geni espressi differenzialmente ottenuti con il trattamento con QMR 80 non sono stati ulteriormente studiati, a causa del cambiamento e della significatività inferiore rispetto all'impostazione a 40.

I nostri risultati di sei esperimenti indipendenti hanno rivelato un significativo aumento dell'espressione di MMP1, PLAT e ARHGAP22, mentre il gene A2M ha mostrato una significativa diminuzione dell'espressione rispetto ai controlli. Al contrario, SLIT2, CORO1B, SHC1 e FN1 non sono stati trovati modulati dal trattamento QMR, in parte confermando i dati sul microarray del cDNA (Fig 7).

### Discussione

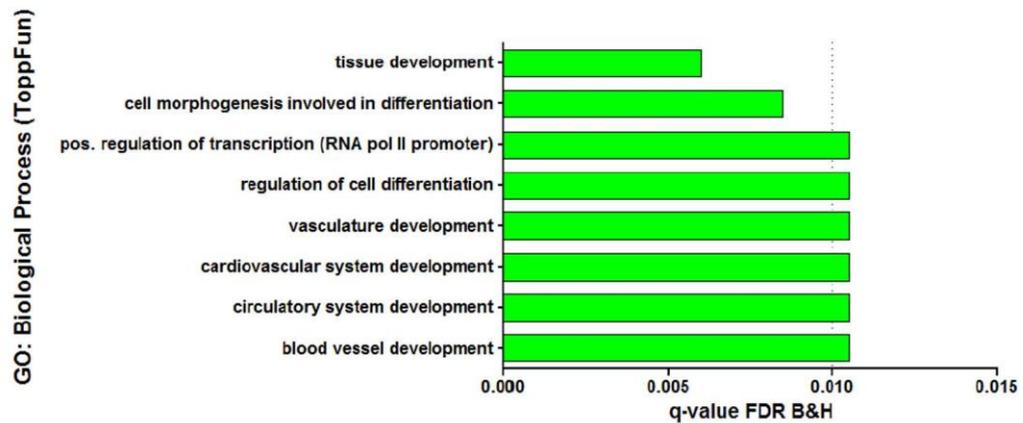
Abbiamo analizzato gli effetti del trattamento QMR su MSC *in vitro* a livello cellulare e molecolare.

A livello cellulare, abbiamo osservato che il trattamento con QMR ha mantenuto la morfologia e la vitalità cellulare invariate, il fenotipo cellulare almeno basato sull'analisi dei marcatori cellulari e sulla proliferazione cellulare.

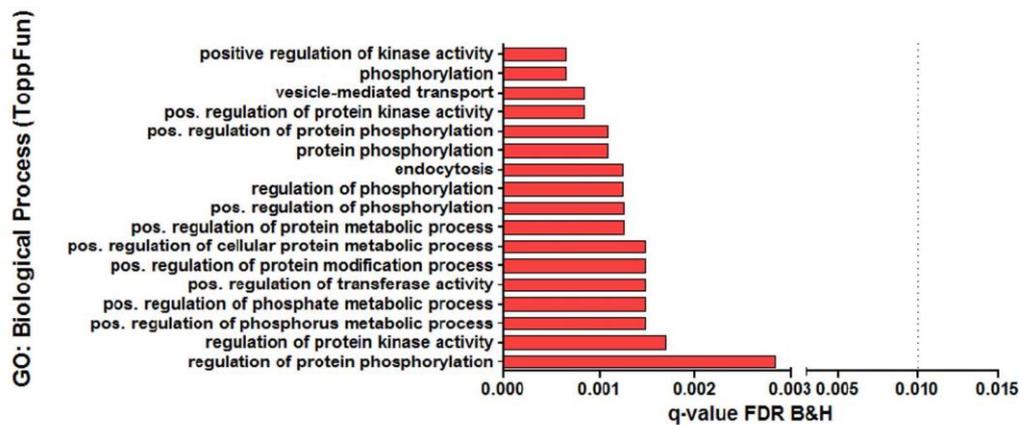
È stato evidenziato che campi elettromagnetici ed elettrici hanno la capacità di modificare la fisiologia cellulare e i percorsi di segnalazione alterando i canali ionici, l'attivazione delle proteine di trasporto e la concentrazione ionica intracellulare [1, 32]. In particolare, alcuni autori hanno suggerito che l'EMF influisce sulle fasi iniziali della differenziazione e riduce i tempi di differenziazione [33, 34]. Inoltre, Teven e colleghi [35] hanno dimostrato che la stimolazione EMF pulsata ad alta frequenza ha aumentato la differenziazione osteogenica. Abbiamo osservato che la capacità di MSC esposta a QMR di generare tessuti mesodermici *in vitro* è rimasta inalterata dal trattamento.

Per studiare un possibile effetto della QMR a livello trascrizionale, abbiamo eseguito l'analisi dell'espressione genica. Come previsto per le cellule derivate dal donatore, l'analisi su microarray del cDNA ha rivelato un'elevata variabilità tra i diversi lotti di MSC. Questa osservazione spiegava il basso numero di DEG altamente significativi tra diverse condizioni e controlli QMR. L'analisi del DEG ha anche rivelato che le MSC esposte a 40 parametri QMR sono state sottoposte a ulteriori cambiamenti trascrizionali, suggerendo che il trattamento con questa potenza nominale è più efficace di 80 QMR. In entrambi i casi, l'ampiezza relativamente bassa dei cambiamenti conferma le osservazioni fenotipiche. La ragione del perché nella nostra impostazione sperimentale la stimolazione a 40 fosse più efficace di 80 rimane poco chiara. In letteratura ci sono domande aperte sul meccanismo di azione dei campi elettromagnetici [36]. Poiché un possibile meccanismo di azione potrebbe essere correlato alle vibrazioni strutturali di molecole elettricamente polari o strutture più grandi, è probabile che una molecola e un sistema biologico potrebbero essere più sensibili a una particolare intensità di stimolazione in funzione della sua polarità, ma sono necessari ulteriori studi per chiarire il problema.

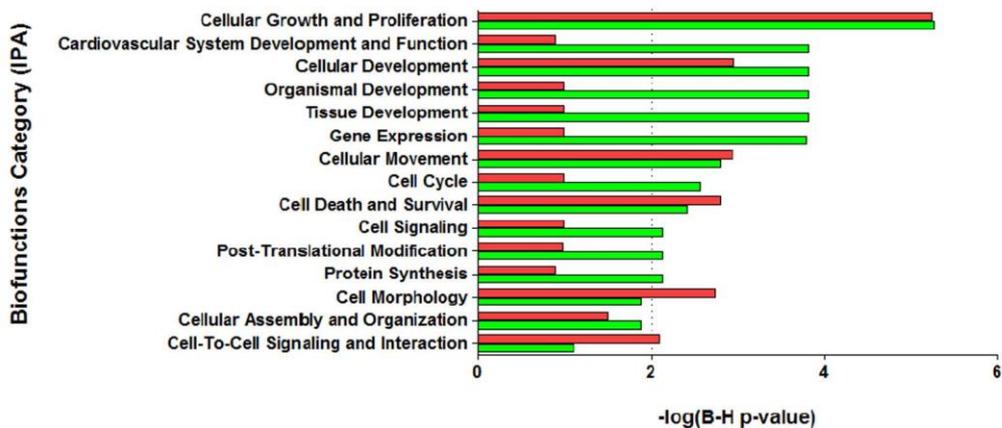
A



B



C



**Fig 6. Migliori liste di geni di arricchimento.** Analisi dell'arricchimento funzionale del gene utilizzando lo strumento ToppFun (applicazione di ToppGene Suite) per A) DEG sovraregolato e B) sottoregolato tra settaggio QMR a 40 e controllo con arricchimento significativo (linea tratteggiata) per valore q FDR B & H <0,01); C) Analisi comparativa dell'arricchimento funzionale sovraregolato (barra verde) e sottoregolato (barra rossa) utilizzando il software IPA con arricchimento significativo (linea tratteggiata) per  $-\log_2$  (valore p di BH) >2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g006>

L'analisi di arricchimento della serie genica di DEG, eseguita per capire quali principali processi biologici fossero coinvolti, ha rivelato che la stimolazione QMR su colture MSC interessava molte biofunzioni diverse. Infatti, abbiamo trovato geni modulati trascrizionalmente correlati ai processi di sviluppo, alla regolazione della fosforilazione, alla regolazione delle vie cellulari incluso il metabolismo, l'attività della chinasi e l'organizzazione cellulare. Le liste di arricchimento più rappresentate tra i geni regolati erano correlate allo sviluppo del sistema cardiovascolare, come osservato anche da Serena et al [8] con la stimolazione elettrica delle cellule staminali embrionali umane. Sheikh e colleghi [37] hanno mostrato che i campi elettrici inducevano la regolazione della risposta antigenica endoteliale tramite l'attivazione del pathway MAPK/ERK. In particolare, la nostra analisi genica ha anche rivelato che 40 geni sovraregolati erano coinvolti nei processi di sviluppo cellulare e tissutale come rimodellamento ECM, angiogenesi, migrazione cellulare e regolazione dei filamenti di actina.

I geni più rappresentativi per ciascuna categoria sono stati ulteriormente convalidati da una PCR quantitativa in tempo reale su MSC esposta a potenza nominale 40 dopo un singolo ciclo QMR. Complessivamente, il 50% di essi comprendente ARHGAP22, MMP1, PLAT e A2M è stato trovato significativamente modulato rispetto ai controlli. ARHGAP22 è un gene che esprime una proteina citoplasmatica RhoGAP coinvolta nell'angiogenesi e nella regolazione negativa del riarrangiamento dei filamenti di actina attraverso l'inibizione di Rac1 [38, 39]. Questo dato è interessante poiché alcune frequenze prodotte dal trattamento QMR rientrano nell'intervallo endogeno che influenza i filamenti di actina e microtubuli [40].

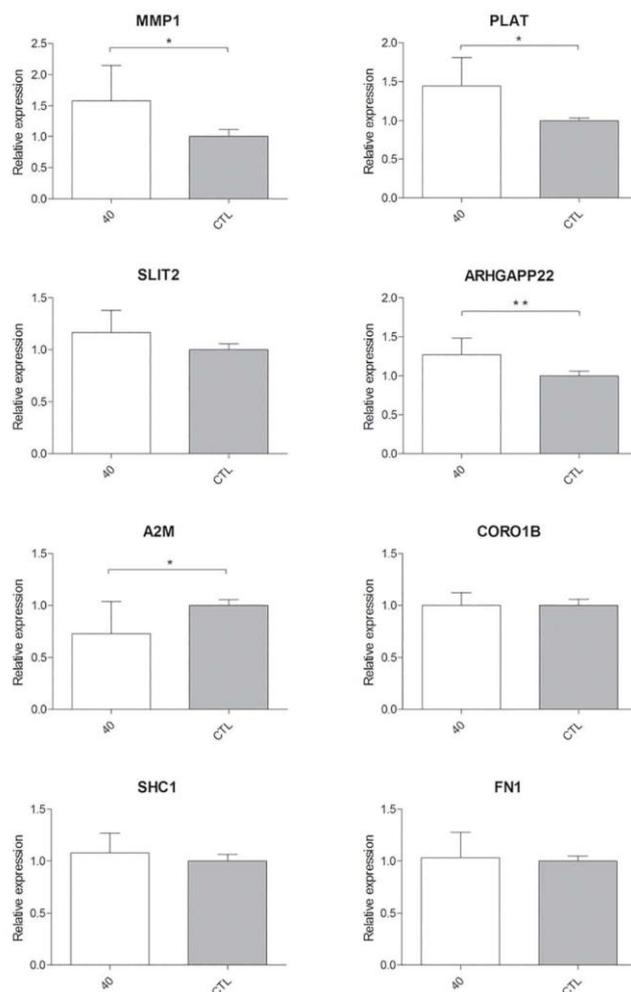
È interessante notare che i geni MMP1, PLAT e A2M differenzialmente regolati sono coinvolti nel rimodellamento della ECM attraverso il sistema fibrinolitico implicato anche nell'embriogenesi, nella cicatrizzazione delle ferite e dell'angiogenesi [41].

PLAT è una serina proteasi che converte il plasminogeno in plasmina dove quest'ultimo attiva altre proteasi tra cui MMP1 [41]. Neuss e collaboratori [42] hanno dimostrato che la MSC era in grado di secernere enzimi coinvolti in questo percorso biologico e i nostri risultati hanno mostrato la sua promozione mediante MSC stimolata. In particolare, la regolazione positiva dei due enzimi PLAT (proteina a monte) e MMP1 (proteina a valle) era in accordo con la regolazione negativa dell'inibitore delle proteasi A2M.

**Tabella 1. Geni selezionati per testare risultati di microarray del DNA in PCR quantitativa in tempo reale.**

Nome del gene	Denominazione tassonomica	Valore P	Variazioni multiple	Nome della proteina	Funzione
<b>MMP</b>	NM_002421	0,00007	1,6	Collagenasi interstiziale	Scinde collagene di tipi I, II e III
<b>PLAT</b>	NM_000930	0,003	1,4	Attivatore plasminogenico dei tessuti	Ruolo nel rimodellamento tissutale
<b>SLIT2</b>	NM_004787	0,003	1,3	Proteina scissa omologo 2	Guida molecolare nella migrazione cellulare
<b>ARHGAP22</b>	NM_021226	0,004	1,3	Proteina Rho GTPasi-attivante 22	Regola la formazione del tubo capillare delle cellule endoteliali
<b>A2M</b>	NM_000014	0,00005	-2,1	Alfa2-macroglobulina	Inibitore delle proteinasi
<b>CORO1B</b>	NM_020441	0,001	-1,4	Coronina-1B	Regola la dinamica e la motilità cellulare
<b>SHC1</b>	NM_183001	0,002	-1,5	Proteina trasformante SHC 1	Adattatore di segnalazione
<b>FN1</b>	NM_054034	0,005	-1,4	Fibronectina	Coinvolta nell'adesione cellulare e nella motilità

I geni individuati hanno preso parte ai processi biologici in cui la MSC potrebbe svolgere un ruolo nel supporto rigenerativo dopo la stimolazione QMR.



**Fig 7. Relative gene expressions using quantitative real-time PCR.** Expression of 8 genes selected by cDNA microarray was illustrated after  $n = 6$  independent experiments using TBP as representative reference gene; mean  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190082.g007>

Le proteasi partecipano alla regolazione dell'angiogenesi attraverso una modulazione di un processo estremamente complesso [43] mentre la proteolisi extracellulare è un requisito per la formazione di nuovi vasi sanguigni. Pertanto, le metalloproteinasi della matrice e i sistemi plasminogeno-attivatore-plasmina giocano un ruolo importante durante l'angiogenesi [44, 45]. Il loro rilascio consente la biodisponibilità dei fattori immagazzinati nel serbatoio ECM [46-48] e PLAT è in grado di attivare PDGF-C [49]. Altri studi hanno dimostrato un'induzione diretta di fattori angiogenici utilizzando la corrente elettrica [50-52].

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che nel nostro modello trattato con QMR la MSC manteneva inalterati il fenotipo cellulare, la vitalità, la proliferazione e la capacità della MSC di differenziarsi in osso, cartilagine e tessuto adiposo. L'analisi del microarray cDNA può suggerire un coinvolgimento di alcuni geni dopo il trattamento nell'angiogenesi e nella rigenerazione tissutale probabilmente attraverso il rimodellamento dell'ECM. Nel presente studio, la variabilità da donatore a donatore può aver limitato la solidità dei dati di microarray per rilevare una modulazione subdola nel profilo di espressione genica. Tuttavia, le modifiche validate in tempo reale della PCR sono state rilevate nei geni altamente regolati in MSC trattate con QMR, relativamente all'impostazione più bassa testata. Ulteriori studi sono necessari per confermare i nostri risultati sia a livello proteico sia a livello funzionale su diversi modelli cellulari.

## Informazioni di supporto

**S1 Fig. Migliori elenchi di geni di arricchimento di DEG regolati verso alto e basso tra impostazione QMR 80 e controllo usando il software IPA.** La figura illustra l'analisi comparativa dell'arricchimento funzionale up-regolato (barra verde) e down-regolato (barra rossa) utilizzando il software IPA con arricchimento significativo (linea tratteggiata) per  $-\log_2$  (valore p di BH)  $>1.3$ . (TIF)

**S2 Fig. Intensità della fluorescenza mediana relativa dei marcatori MSC dopo stimolazione QMR a impostazioni diverse.** A) Primo ciclo di trattamento; B) Secondo ciclo di trattamento. Le barre rappresentavano i valori massimo, mediano e minimo di 3 esperimenti indipendenti. L'asse y era in scala  $\log_{10}$ . (TIF)

## Ringraziamenti

Siamo grati ai donatori di midollo osseo per il loro consenso. Grazie anche ai medici e infermieri del reparto di ematologia dell'Ospedale S. Bortolo per la raccolta del midollo osseo.

Ringraziamo Tarcisio Fedrizzi (CIBIO Bioinformatics Core Facility) per l'aiuto nell'analisi di pre-elaborazione dei microarray. Siamo anche in debito con Davide Pozzato e Alberto Cipullo per la discussione critica dell'articolo.