



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dottorato di ricerca in
Biochimica e patologia dell'azione dei farmaci
X ciclo nuova serie
2008-2012

**Valutazione dell'induzione di risposta adattativa a
mutageni in colture cellulari di mammifero in seguito ad
esposizione a campi elettromagnetici non ionizzanti**

Dottoranda	Anna Sannino
Tutor	Ch.ma Prof. Maria Antonietta Belisario
Co-tutor	Dott.ssa Maria Rosaria Scarfi
Coordinatore	Ch.ma Prof. Antonietta Leone

A mio figlio
Michele Agostino

INDICE

RIASSUNTO	pag 1
ABSTRACT	pag 3
INTRODUZIONE	pag 5
SCOPO DELLA TESI	pag 6
Capitolo 1	
La Risposta Adattativa	pag 7
1.1 Caratteri generali	pag 7
1.1.1 Fattori che influenzano l'induzione di RA	pag 7
1.1.2 Variabilità inter e intra-individuale nella RA	pag 8
1.2 Meccanismi	pag 8
1.3 RA da RF	pag 10
1.4 Possibili applicazioni	pag 10
Capitolo 2	
Campi Elettromagnetici a Radiofrequenza	pag 11
2.1 Caratteri generali	pag 11
2.2 Interazioni tra campi elettromagnetici a RF e materia vivente	pag 12
2.3 Valutazione degli effetti genotossici indotti da CEM non ionizzanti alle frequenze in uso per la telefonia cellulare	pag 14
2.4 Requisiti sperimentali per studi in vitro rivolti alla valutazione degli effetti biologici delle RF	pag 16
2.4.1 Requisiti biologici	pag 16
2.4.2 Requisiti elettromagnetici	pag 17
Capitolo 3	
Metodi di indagine impegnati per la valutazione dell'induzione di effetti genotossici e citotossici	pag 19
3.1 Indicatori citogenetici di genotossicità	pag 19
3.1.1 Test del micronucleo	pag 19
3.1.2 Il linfocita quale dosimetro biologico	pag 21
3.2 Apoptosi	pag 22
3.3 Ciclo cellulare	pag 24

Capitolo 4	
Materiali e Metodi	pag 27
4.1 Colture cellulari	pag 27
4.2 Trattamenti con Mitomicina-C (MMC)	pag 27
4.3 Trattamenti con 3-Aminobenzamide (3AB)	pag 28
4.4 Esposizioni a raggi X	pag 28
4.5 Esposizioni a radiofrequenza	pag 29
4.6 Test del micronucleo con blocco della citodieresi	pag 32
4.7 Indice di proliferazione	pag 33
4.8 Test di esclusione del Trypan Blue	pag 33
4.9 Test dell'Annexina V-FITC/PI	pag 33
4.10 Test di incorporazione dello ioduro di propidio (PI)	pag 33
4.11 Procedure sperimentali	pag 34
4.11.1 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (900 MHz) in colture di linfociti umani: ruolo della fase del ciclo cellulare	pag 34
4.11.2 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani	pag 35
4.11.3 Risposta adattativa ai raggi X indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani	pag 36
4.11.4 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz): il ruolo del tipo cellulare impiegato	pag 36
4.11.5 Valutazione dei possibili meccanismi di azione alla base della RA indotta da RF	pag 37
4.12 Analisi statistica	pag 38
Capitolo 5	
Risultati	pag 39
5.1 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (900 MHz) in colture di linfociti umani: ruolo della fase del ciclo cellulare	pag 39
5.2 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani	pag 43
5.3 Risposta adattativa ai raggi X indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani	pag 47
5.4 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz): il ruolo del tipo cellulare impiegato	pag 51
5.5 Valutazione dei possibili meccanismi di azione alla base della RA indotta da RF	pag 55
5.5.1 Sperimentazione in colture di V79	pag 55
5.5.2 Sperimentazione in colture di linfociti umani da sangue periferico	pag 60

Capitolo 6	
Discussione e conclusioni	pag 64
BIBLIOGRAFIA	pagI-IX
RINGRAZIAMENTI	

Nell'ambito del progetto di ricerca dal titolo "Valutazione dell'induzione di risposta adattativa a mutageni in colture cellulari di mammifero in seguito ad esposizioni a campi elettromagnetici non ionizzanti" è stato caratterizzato l'effetto protettivo (risposta adattativa) dell'esposizione a radiofrequenza (RF) dal danno indotto in colture cellulari da agenti a nota azione genotossica. La sperimentazione è stata eseguita in colture cellulari primarie (linfociti umani da 27 donatori sani) e in colture stabilizzate di roditore (fibroblasti di polmone di criceto, V79).

In una fase iniziale, l'attività di ricerca ha riguardato l'approfondimento di osservazioni precedenti, dove si era riscontrato che linfociti umani da sangue periferico, pre-esposti ad un campo elettromagnetico alla frequenza di 900 MHz, segnale GSM, e trattati con Mitomicina C (MMC) mostravano un danno cromosomico ridotto rispetto ai trattamenti con sola MMC (Sannino et al., 2009). Applicando il test del micronucleo (MN) col blocco della citodieresi, è stato infatti, dimostrato che la pre-esposizione a RF è in grado di proteggere dal danno al DNA solo quando viene effettuata nella fase S del ciclo cellulare, inducendo risposta adattativa (RA), ma non ha alcun effetto in fase G0 o G1.

Successivamente, l'attenzione è stata focalizzata su un segnale di telefonia mobile di terza generazione quale il segnale UMTS alla frequenza di 1950 MHz per valutare il ruolo a) dei parametri dell'esposizione (frequenza, modulazione e tasso di assorbimento specifico, SAR), b) del mutageno impiegato e c) del modello cellulare nella RA indotta da RF. La sperimentazione su colture cellulari di linfociti da sangue periferico ha evidenziato che anche pre-esposizioni a 1950 MHz sono in grado di evocare risposta adattativa, ma il grado di protezione dal danno indotto da MMC è strettamente dipendente dal SAR applicato. Inoltre, le stesse condizioni di esposizione si sono mostrate efficaci anche nella protezione di danno cromosomico indotto da trattamenti con raggi X, evidenziando che pre-esposizioni a RF sono in grado di ridurre il danno al DNA indipendentemente dalla natura e dal meccanismo di azione del mutageno impiegato. Infatti, mentre la MMC è un agente alchilante che induce cross-link nella molecola di DNA, i raggi X sono un agente clastogeno che induce rotture del singolo e doppio filamento. Risultati analoghi sono stati ottenuti quando sono state impiegate le V79 come modello cellulare, mostrando che il fenomeno dell'adattamento da RF non è limitato a cellule primarie quali i linfociti umani ma si riscontra anche in linee cellulari stabilizzate, sebbene in quest'ultimo caso siano richieste condizioni sperimentali più spinte, sia in termini di pre-trattamento (SAR) che di dosi di MMC.

L'ultima parte del lavoro sperimentale ha riguardato la valutazione dei possibili meccanismi di azione alla base della RA indotta da RF, sulla base delle indicazioni riportate in letteratura sulla RA indotta da radiazioni ionizzanti. A tale scopo, nelle condizioni sperimentali che davano adattamento nei due tipi cellulari studiati, sono stati valutati effetti sulla vitalità cellulare (test di esclusione del tripan blue), sulla progressione del ciclo cellulare (test citofluorimetrico di incorporazione dello ioduro di propidio) e sul sistema di riparo del DNA (inibizione degli enzimi di riparazione mediante trattamento con 3-Aminobenzamide, 3AB). Nel caso dei linfociti umani è stata anche valutata l'apoptosi mediante il test citofluorimetrico dell'annessina V-FITC/ioduro di propidio.

I risultati ottenuti sia con i linfociti umani sia con le V79 indicano che i meccanismi di azione alla base della risposta adattativa indotta da RF non coinvolgono la vitalità, il ciclo cellulare e l'apoptosi. Invece, è stato evidenziato un possibile ruolo degli enzimi di riparo del DNA nell'induzione del fenomeno. Infatti, in colture trattate con 3AB, che inibisce il legame della poli(ADP-ribosio) polimerasi alla cromatina, non si osserva adattamento.

E' interessante sottolineare che, a conferma delle osservazioni riportate in questo progetto di ricerca, nel periodo di svolgimento del presente dottorato altri gruppi hanno riscontrato la capacità della RF ad indurre RA sia *in vitro* in colture di HL-60 (Jin et al., 2012) sia *in vivo* in topi e ratti (Cao et al., 2010, 2011; Jiang et al., 2012; Mortazavi et al., 2011, 2012) valutando differenti target biologici.

In the framework of the research project "Assessment of the adaptive response to mutagens in mammalian cell cultures induced by exposures to non ionizing electromagnetic fields", the protective effect (adaptive response, AR) of radiofrequency (RF) exposures has been characterized with respect to agents with well-known genotoxic action. The experimental activity has been carried out on primary cell cultures (human blood lymphocytes from 27 healthy donors) and on stabilized rodent cultures (hamster lung fibroblasts, V79 cells).

In the first phase of the research activity, previous observations have been given insight, in which it was found that peripheral blood lymphocytes pre-exposed to 900 MHz electromagnetic field, GSM signal, and subsequently treated with Mitomycin C (MMC), exhibited a reduced chromosomal damage with respect to those treated only with MMC (Sannino et al., 2009). By applying the cytokinesis-block micronucleus assay, it has been demonstrated that pre-exposure to RF is capable of inducing AR only when carried out during the S-phase of the cell cycle, but has no effect when given during the G0 or G1 phases.

Then, adaptive response has been assessed with respect to a third generation mobile phone signal, the UMTS signal at 1950 MHz, in order to evaluate the role of the a) exposure electromagnetic parameters (frequency, modulation scheme, and specific absorption rate, SAR), b) mutagen agent, and c) cell model, on the RF-induced AR. The experimental activity, carried out on peripheral blood lymphocytes, demonstrated that pre-exposures to 1950 MHz electromagnetic fields are capable of inducing AR, but the extent of protection from DNA damage strictly depends on the applied SAR. Moreover, the same exposure conditions have been demonstrated to be effective also with respect to chromosomal damage induced by X-ray treatments. In such a way, it has been highlighted that RF pre-exposures are able to reduce DNA damage irrespective of the type and action mechanism of the mutagen agent. As a matter of fact, while MMC is an alkylating, cross-link inductor agent, X-rays are clastogen, i.e. they induce DNA single or double strand breaks. Similar results have been obtained when V79 cell cultures were used as cell model, showing that RF-induced AR is not limited to primary cell cultures but can be extended also to stabilized cell cultures, although, in the latter case, stronger experimental conditions are required, in terms of both pre-exposures (SAR) and MMC doses.

The final phase of the experimental activity concerned the evaluation of possible action mechanisms underlying RF-induced AR, on the bases of indications available in the literature on ionizing radiation-induced AR. To this aim, in the same experimental conditions that induced AR in the considered cell models, cell viability (trypan blue exclusion method), cell cycle progression (cytofluorimetric assay evaluating propidium iodide uptake), and DNA repair mechanisms (repairing enzymes inhibition by 3-Aminobenzamide, 3AB, treatment) have been evaluated. In the case of human blood lymphocytes, apoptosis has been also studied by means of the cytofluorimetric annexin V-FITC/propidium iodide assay.

The obtained results indicated that neither cell viability, nor cell cycle nor apoptosis are involved in the mechanisms underlying the RF-induced AR in both lymphocytes and V79 cells.

On the contrary, a possible involvement of DNA repairing enzymes in the AR phenomenon has been highlighted. As a matter of fact, cell cultures treated with 3AB, which inhibits the poly(ADP-ribose) polymerase link with chromatine, did not exhibit AR.

It is noteworthy that, as a confirmation of the results reported in this research project, in the same period, RF-induced AR has been reported by other research groups, both *in vitro* on HL-60 cell cultures (Jin et al., 2012), and *in vivo* on mice and

Abstract

rats (Cao et al., 2010, 2011; Jiang et al., 2012; Mortazavi et al., 2011, 2012), by evaluating different biological targets.

Negli ultimi decenni l'esposizione ai campi elettromagnetici non ionizzanti è aumentata con continuità ed in misura considerevole. Pertanto, la crescente presenza sul territorio di sorgenti di tali radiazioni ha reso di grande attualità la valutazione di eventuali problemi connessi alla salute dell'uomo. In particolare, l'attenzione è rivolta alle frequenze in uso per la telefonia cellulare (radiofrequenze) legate al diffuso impiego sia degli apparecchi di telefonia mobile, sia delle stazioni radio-base.

A testimonianza della grande attenzione della comunità scientifica su tale argomento, la International Agency for Research on Cancer (IARC) recentemente ha classificato le radiofrequenze (30 kHz-300 GHz; RF) come "possibili cancerogeni" (classe 2B) per l'uomo, essenzialmente sulla base di evidenze epidemiologiche che indicavano una associazione positiva tra esposizioni a tali radiazioni e l'insorgenza di tumori al cervello (glioma, neurinoma) (Baan et al., 2011; IARC, 2012). Tuttavia, i risultati in vitro e in vivo riportati in letteratura non indicano una chiara relazione tra tali esposizioni e l'induzione di effetti correlati alla cancerogenesi genotossica e/o non genotossica. In particolare, allo stato attuale delle conoscenze, non ci sono indicazioni certe sul potenziale genotossico delle RF (Vershaeve L., 2005; Vijayalaxmi and Obe, 2005; Vijayalaxmi and Prihoda, 2008; 2012).

D'altro canto, considerando l'elevato grado di inquinamento chimico, si pone anche il problema dei rischi per la salute umana legati alla presenza contemporanea di una molteplicità di agenti chimici e fisici sia nell'ambiente di vita che in ambito occupazionale. Infatti, la maggior parte delle sostanze inquinanti possiede attività tossica anche quando presenti a concentrazioni al di sotto del limite di rilevanza strumentale e altre possono interagire tra di loro con effetti additivi, sinergici o antagonisti.

L'effetto combinato di più agenti si definisce additivo quando è uguale a quello della somma degli effetti dei singoli agenti, sinergico quando è maggiore della somma degli effetti dei singoli agenti e antagonista quando è di minore entità rispetto alla somma degli effetti di ogni singolo agente. Un caso particolare di antagonismo è la risposta adattativa, un fenomeno non specifico per il quale esposizioni a dosi molto basse di un agente tossico inducono resistenza a successivi trattamenti a dosi tossiche dello stesso agente o di altri tipi di agenti (Olivieri et al., 1984). Essa assume un ruolo particolarmente interessante nel caso di agenti mutageni che, interagendo con la molecola di DNA, possono alterarne la struttura, il contenuto informativo e la segregazione, favorendo l'insorgenza di cancerogenesi.

Recenti risultati ottenuti presso il laboratorio di Bioelettromagnetismo dell'IREA-CNR di Napoli, hanno evidenziato l'inaspettata capacità di esposizioni a campi elettromagnetici non ionizzanti, quali quelli in uso per la telefonia cellulare, ad indurre risposta adattativa alla Mitomicina C in colture di linfociti umani (Sannino et al., 2009). Considerando l'assenza di indicazioni certe sulla genotossicità delle radiofrequenze, questa osservazione è particolarmente rilevante in vista di potenziali applicazioni innovative, evitando il rischio di trasformazione cellulare dovuto ad alterazioni biologiche per esposizioni protratte a basse dosi di agenti mutageni. Infatti, l'induzione di risposta adattativa potrebbe essere impiegata per proteggere l'uomo da esposizioni genotossiche per fini occupazionali o diagnostici. Inoltre, è stato recentemente suggerito l'impiego della radiofrequenza quale agente non genotossico per fornire protezione da radiazioni cosmiche agli astronauti durante le missioni spaziali a lungo termine (Abdollahi et al., 2012). Ovviamente, ai fini di tali potenziali applicazioni, sono necessari ulteriori approfondimenti per caratterizzare il fenomeno della risposta adattativa indotta da radiofrequenza.

Le attività di ricerca svolte nel presente lavoro di tesi si inquadrano nello studio più ampio delle possibili interazioni tra campi elettromagnetici non ionizzanti e i sistemi biologici, con particolare riferimento agli effetti cooperativi con inquinanti ambientali, un argomento di grande interesse negli ultimi decenni, a causa della enorme diffusione nella vita di tutti i giorni e negli ambienti di lavoro di tecnologie che impiegano tali radiazioni e dell'alto grado di inquinamento ambientale.

Osservazioni precedenti avevano evidenziato per la prima volta che pre-esposizioni di colture di linfociti umani alla frequenza di 900 MHz (segnale GSM e tasso di assorbimento specifico di 1.25 W/kg), erano in grado di ridurre il danno al DNA prodotto da una dose genotossica di Mitomicina C (Sannino et al., 2009).

L'obiettivo principale del presente lavoro di tesi è di rafforzare tali osservazioni su un numero maggiore di individui e caratterizzare il fenomeno della risposta adattativa indotta da radiofrequenza, valutando il ruolo della fase del ciclo cellulare nell'insorgenza del fenomeno. Inoltre, focalizzando l'attenzione su un segnale di telefonia mobile di terza generazione, è stata valutata la dipendenza del fenomeno dai parametri dell'esposizione (frequenza, modulazione, tasso di assorbimento specifico) e dal meccanismo di azione dell'agente mutageno, oltre alla sensibilità di differenti tipi cellulari.

Infine, sono stati studiati alcuni dei possibili meccanismi di azione coinvolti nella risposta adattativa da radiofrequenza.

CAPITOLO 1

La Risposta Adattativa

1.1 Caratteri generali

Quando cellule sono esposte a dosi estremamente basse (dose adattante, AD) di un agente tossico diventano meno suscettibili al danno indotto da una successiva dose tossica (dose challenge, CD) dello stesso o altro agente. Questo fenomeno, definito risposta adattativa (RA) è stato osservato per la prima volta da Samson e Cairns (1977) in colture di *Escherichia Coli* esposte a bassissime dosi dell'agente alchilante N-metil-nitrosoguanidina e successivamente stimolate con una dose più alta dello stesso agente. Le colture pretrattate con la bassa dose mostravano una maggiore sopravvivenza e un minore danno al DNA rispetto alle colture non pretrattate. Tale fenomeno è stato anche riportato in seguito a basse dosi di radiazioni ionizzanti in cellule umane. In particolare, in linfociti umani trattati con timidina triziata (Olivieri et al., 1984) o con basse dosi di raggi X (Shadley and Wolff, 1987) e poi esposti a un'alta dose di raggi X è stata riscontrata una riduzione del 50% nella frequenza di aberrazioni cromosomiche in cellule pre-esposte.

In seguito a questo studio sono stati pubblicati numerosi altri lavori che hanno mostrato RA indotta da agenti genotossici fisici o chimici o dalla combinazione di entrambi (cross-adattamento), in differenti organismi, dai batteri all'uomo (Dimova et al., 2008).

Sebbene la maggior parte degli studi in vitro sia stata svolta in colture di linfociti umani da sangue periferico, la RA è stata anche dimostrata in fibroblasti umani (Azzam et al., 1992), in cellule di midollo osseo di roditore (Farooqi and Kesevan, 1993), in spermatozoi di roditore (Cai and Liu, 1990) cellule di Hamster Cinese (Ikushima, 1987) e in svariate linee cellulari normali (Seong et al., 1995). Per quanto riguarda le cellule tumorali, alcuni autori hanno riscontrato assenza di adattamento nelle stesse condizioni sperimentali che erano risultate efficaci a indurre RA in cellule normali (Schwartz et al., 2008).

Nella maggior parte dei casi l'adattamento è stato valutato mediante il test delle aberrazioni cromosomiche, sebbene molti autori abbiano anche impiegato altri endpoint di danno cromosomico, quali lo scambio tra cromatidi fratelli (Moquet et al., 1989, Ikushima, 1987), l'induzione di micronuclei (Fan et al., 1990; Azzam et al., 1992, 1994), le singole e doppie rotture al DNA (Dimova, 2008) le mutazioni geniche (Sanderson and Morley, 1986, Kelsey et al., 1991, Rigaud et al., 1993). La RA è stata inoltre evidenziata in termini di sopravvivenza cellulare (Wolff, 1996), stress ossidativo (Joksic et al., 2000), alterazioni del ciclo cellulare (Salone et al., 1996; Meyers et al., 1994), apoptosi (Stoilov et al., 2007, Krishnaja et al., 2008), espressione genica (Martin et al., 1995; Rigaud et al., 1996).

1.1.1 Fattori che influenzano l'induzione di RA

E' stato dimostrato che l'induzione di RA è influenzata da diversi fattori, tra cui la dose degli agenti adattante e challenge (Shadley et al., 1987; Madrigal-Bujaidar et al., 1994; Matsumoto et al., 2004) e l'intervallo di tempo che intercorre tra i due trattamenti. Inoltre, una volta indotta, la RA persiste per almeno 3 cicli cellulari

(Shadley et al., 1987) e il fenomeno non dipende dal numero di trattamenti effettuati. Infatti, non sono state trovate significative differenze, in termini di aumentata protezione, per le cellule trattate con due dosi adattanti rispetto a quelle a cui è stata somministrata un'unica dose di valore pari alla somma delle due (Fan et al., 1990).

Un ruolo importante è anche rivestito dalla fase del ciclo cellulare in cui sono somministrati la dose adattante e challenge. In letteratura è stato dimostrato che l'adattamento è indotto se il pre-trattamento è eseguito in fase G1 (Shadley and Day, 1992) o S (Shadley et al., 1987; Cai and Liu, 1990) mentre i risultati sono contrastanti per dosi adattanti in fase G0: alcuni autori riportano che trattamenti in G0 non sono efficaci nell'indurre AR (Shadley et al., 1987, Moquet et al., 1989) mentre altri autori ne dimostrano l'efficacia (Cai and Liu, 1990; Khandogina et al., 1991). Per quanto riguarda la dose challenge, i trattamenti devono essere eseguiti in fase S o G2 (Ryabchenko et al., 1998).

1.1.2 Variabilità inter e intra-individuale nella RA

Gli studi di RA in linfociti umani mostrano un alto grado di variabilità inter e intra individuale (Bosi and Olivieri, 1989; Sankaranarayanan et al., 1989; Bauchinger et al., 1989; Olivieri and Bosi, 1990). In esperimenti condotti su un numero elevato di donatori, la RA era osservata tra il 50-78% degli individui esaminati, e l'entità dell'adattamento variava tra l'11 e il 32% (Tapio et al., 2007). Alcuni autori suggeriscono che la RA dipende da tratti costituzionali genetici stabili del donatore, anche se lo stesso soggetto può mostrare entità di adattamento diverso (o assenza) in funzione di condizioni fisiologiche transienti, se è affetto da patologie o se ha un'età superiore ai 45 anni (Vijayalaxmi et al., 1995). Per convenzione, gli individui che presentano adattamento sono definiti "responder" mentre i "non responder" sono quelli che non rispondono ai trattamenti (Vijayalaxmi et al., 1995; Mortazavi et al., 2003). Inoltre, lo stesso soggetto può mostrare diversa entità di adattamento in base al meccanismo di azione dell'induttore impiegato. Ad esempio, è stato evidenziato che la Bleomicina (BLM, un agente radiomimetico che causa principalmente rotture al singolo e al doppio filamento di DNA) induce un effetto protettivo maggiore rispetto alla Mitomicina-C (un agente alchilante, induttore di cross-link), che probabilmente è riconducibile alla migliore capacità di riparazione del danno indotto da BLM (Schlade-Bartusiak et al., 2002; Krishnaja e Sharma, 2008).

1.2 Meccanismi

Sono stati proposti diversi meccanismi di azione per spiegare l'induzione di RA ma a tutt'oggi non è stato ancora individuato un meccanismo universalmente condiviso (Sasaki et al., 2002; Miura, 2004; Dimova et al., 2008). Il trattamento adattante probabilmente coinvolge la trascrizione di molti geni e l'attivazione di numerosi pathways di segnale che innescano le difese cellulari. Queste ultime si possono manifestare come maggiore efficienza di detossificazione di radicali liberi, sistemi di riparo del DNA, induzione di nuove proteine, e aumentata produzione di antiossidanti (Figura 1.1).

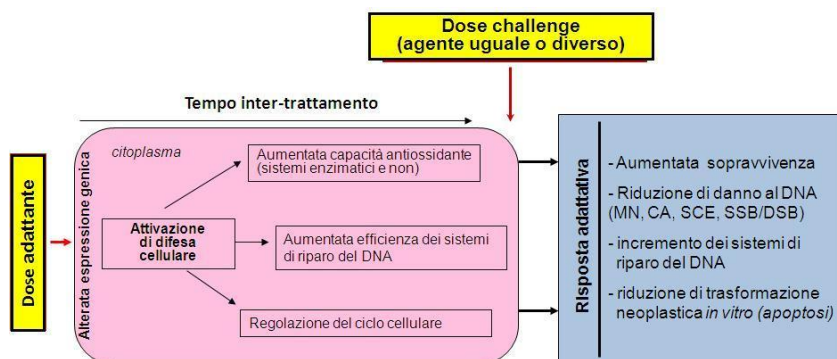


Figura 1.1 - Alcuni basilari meccanismi probabilmente coinvolti nella RA.

L'aumentata attività di enzimi antiossidanti, dopo il trattamento con la dose challenge, consentendo un rapido scavenging di specie reattive dell'ossigeno (ROS) potrebbe essere alla base del minor danno cellulare riscontrato nelle colture adattate (Wolff, 1998; Sasiadek et al., 2002).

L'espressione di proteine heat-shock (HSPs) non può essere esclusa. Le HSP si dividono in due tipi: quelle che sono costitutivamente espresse, e quelle che sono stress indotte. Le HSPs costitutive sono coinvolte nel processo di controllo qualità delle proteine cellulari neo formate, mentre le inducibili sono prodotte in seguito a stress, quale calore, metalli pesanti, radiazioni, con funzione citoprotettiva. Inoltre, è stato osservato che le comunicazioni intercellulari (gap-junctions) possono giocare un ruolo nella risposta cellulare da basse dosi di radiazioni ionizzanti (Miura, 2004).

Le modifiche indotte dalla bassa dose alla conformazione della cromatina potrebbero determinare una minore sensibilità della cromatina stessa al danno indiretto indotto dalla dose challenge o una maggiore accessibilità ai siti danneggiati da parte degli enzimi di riparo (Belyaev et al., 1996). Si potrebbe avere anche un aumento della trascrizione in prossimità di geni che codificano per la proteina p53, che è soppressa nelle cellule che hanno P53 mutato. P53 funge da fattore di trascrizione per numerosi geni soppressori che controllano la progressione del ciclo cellulare, infatti, in presenza di un danno radio-indotto, questa proteina regola la trascrizione di geni che bloccano la cellula in fase G1 del ciclo cellulare; se il danno viene riparato il ciclo cellulare prosegue, se il danno è irreversibile la cellula viene spinta alla morte per apoptosi (Stecca et al., 1998).

Numerosi sono gli studi a supporto del coinvolgimento degli enzimi di riparo e della sintesi proteica. Dall'analisi della cinetica del riparo del DNA è emerso che la RA potrebbe essere il risultato dell'attivazione di enzimi che portano a un minor danno residuo, ma non dall'induzione di meccanismi protettivi che riducono il danno iniziale. Infatti, cellule che esprimono deficienze nel meccanismo di riparo non mostrano adattamento. Diversi autori ritengono che un ruolo chiave sia rivestito dalla poli (ADP-ribosil) polimerasi (PARP), un enzima coinvolto nel riparo delle rotture del DNA indotte da agenti genotossici quali quelli alchilanti e della morte programmata delle cellule (apoptosi). Infatti, è stato dimostrato che l'inibizione specifica di PARP con 3AB applicata immediatamente dopo la dose challenge, era in grado di inibire la RA sia in linfociti umani sia in linee cellulari di fibroblasti di roditore

(V79) (Wiencke et al., 1986; Ikushima et al., 1987; Vijayalaxmi and Burkat, 1989; Kleczkoqska and Althaus, 1996).

1.3 RA da RF

La RA indotta da radiazioni non ionizzanti è stata osservata *in vitro* per la prima volta nel 2009 presso l'IREA-CNR di Napoli. Linfociti da sangue periferico umano esposti ad un campo elettromagnetico a radiofrequenza (900 MHz, GSM, SAR 1.25 W/Kg) sono risultati refrattari al danno indotto da un successivo trattamento con MMC, dimostrando che un agente non genotossico è in grado di indurre adattamento (Sannino et al., 2009).

In seguito, la RA da RF è stata anche riportata da altri autori sia *in vitro* sia *in vivo* (Cao et al., 2010, 2011; Jiang et al., 2012; Mortazavi et al., 2011, 2012; Jin et al., 2012).

1.4 Possibili applicazioni

Nonostante siano ben noti gli effetti della risposta adattativa da radiazioni ionizzanti, le applicazioni mediche sono ancora poco considerate.

Le evidenze scientifiche sull'assenza di adattamento in alcuni tipi di cellule tumorali suggeriscono la possibilità di ottimizzare il bilancio tra il controllo di un tumore locale e il danno al tessuto sano nella radioterapia moderna (Schaffer et al., 2004).

Inoltre, l'induzione di RA potrebbe anche essere impiegata per proteggere l'uomo da esposizioni genotossiche a fini occupazionali o diagnostici, sebbene alcuni autori abbiano sottolineato che esposizioni protratte a basse dosi potrebbero rappresentare un fattore di rischio per la trasformazione cellulare.

CAPITOLO 2

Campi Elettromagnetici a Radiofrequenza

2.1 Caratteri generali

Nell'ambito dello spettro elettromagnetico (Figura 2.1), che rappresenta l'insieme delle radiazioni elettromagnetiche ordinate per frequenza, e quindi energia, crescente, o per lunghezza d'onda decrescente, i campi elettromagnetici a radiofrequenza (RF) ricadono nel range 100 kHz - 300 GHz. Tali radiazioni sono anche dette non ionizzanti in quanto l'energia ad esse associata non è tale da indurre fenomeni di ionizzazione (rottura di legami chimici nelle molecole biologiche) della materia, al contrario di quanto accade con le radiazioni ionizzanti (radiazioni cosmiche, raggi X, raggi gamma), che occupano invece la parte più alta (frequenze > 300 GHz, energia > 12 eV) dello spettro elettromagnetico.

I campi elettromagnetici a RF trovano impiego in un vastissimo range di applicazioni che va dalle telecomunicazioni, alla medicina, all'industria fino alle applicazioni militari, ponendo quindi il problema dell'esposizione umana a tale tipo di radiazione, e, in ultima analisi, della comprensione dei meccanismi di interazione tra radiazioni non ionizzanti e materia vivente.

Nel seguito verrà riportata una breve overview sui meccanismi di interazione tra campi elettromagnetici a RF e materia vivente, facendo riferimento alle principali grandezze utilizzate per descrivere tali fenomeni, ed alle metodologie e ai criteri adottati in ambito scientifico per lo studio degli effetti biologici e dei meccanismi di interazione.

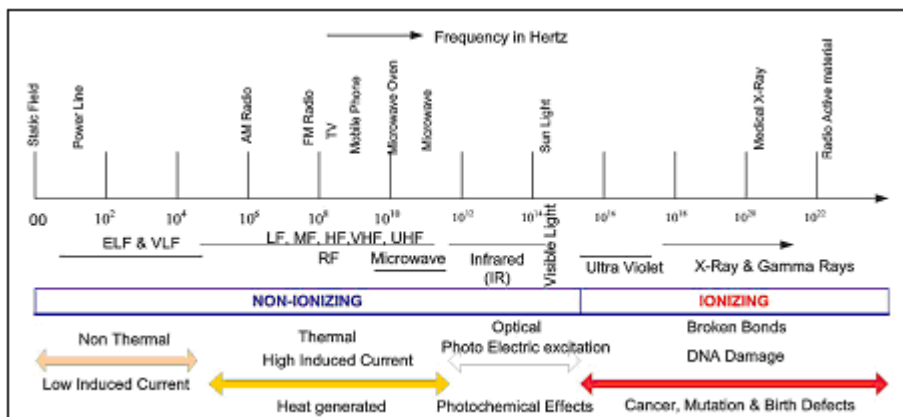


Figura 2.1 - Spettro elettromagnetico.

2.2 Interazioni tra campi elettromagnetici a RF e materia vivente

Il principale meccanismo d'interazione tra campi elettromagnetici a radiofrequenza e materia vivente consiste nell'assorbimento di energia elettromagnetica da parte del sistema biologico interagente.

Infatti, mentre l'esposizione a campi elettrici e magnetici a bassa frequenza normalmente dà luogo ad un assorbimento di energia trascurabile e non produce alcun aumento misurabile di temperatura nel corpo, l'esposizione a campi elettromagnetici di frequenza superiore a circa 100 kHz può portare a significativi assorbimenti di energia e aumenti di temperatura. In generale, l'esposizione a un campo elettromagnetico uniforme dà luogo a una deposizione e ad una distribuzione dell'energia nel corpo molto disuniformi, che devono essere valutate mediante misure e calcoli dosimetrici.

Dal punto di vista dell'assorbimento di energia da parte del corpo umano, i campi elettromagnetici a RF possono essere suddivisi in quattro intervalli di frequenza:

- frequenze da circa 100 kHz a circa 20 MHz, per le quali l'assorbimento nel tronco diminuisce rapidamente al decrescere della frequenza, mentre assorbimenti significativi possono prodursi nel collo e nelle gambe;
- frequenze nell'intervallo tra circa 20 MHz e 300 MHz, per le quali si può presentare un assorbimento relativamente alto nel corpo intero, ed uno ancora più elevato se si considerano gli effetti di risonanza in singole parti del corpo (ad esempio la testa);
- frequenze nell'intervallo da circa 300 MHz a qualche GHz, in corrispondenza delle quali si verifica un significativo e disuniforme assorbimento locale;
- frequenze superiori a circa 10 GHz, per le quali l'assorbimento di energia ha luogo soprattutto sulla superficie del corpo.

E' chiaro, quindi, che l'interazione tra radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti e la materia vivente (cellule, tessuti, organismi) dipende sia dalle caratteristiche della radiazione (frequenza, ampiezza), sia dalle proprietà fisiche (densità di massa) ed elettromagnetiche (conducibilità, permittività dielettrica) del sistema biologico interagente.

Dal momento che l'interazione è fortemente dipendente dalla frequenza, (nel range delle RF la profondità di penetrazione del campo elettromagnetico nei tessuti si riduce all'aumentare della frequenza), le grandezze utilizzate per descrivere l'interazione stessa (grandezze dosimetriche) vengono definite tenendo conto dei diversi intervalli di frequenza e delle diverse forme d'onda. In particolare, si fa riferimento a:

- Densità di corrente, J , nell'intervallo di frequenze fino a 10 MHz;
- Corrente, I , nell'intervallo di frequenze fino a 110 MHz;
- Tasso di assorbimento specifico di energia, SAR, nell'intervallo di frequenze 100 kHz - 10 GHz;
- Assorbimento specifico di energia, SA, per campi pulsati nell'intervallo di frequenze 300 MHz - 10 GHz;
- Densità di potenza, S , nell'intervallo di frequenze 10-30 GHz. (ICNIRP, linee guida 1998).

Nel presente lavoro si farà riferimento a campi elettromagnetici alle frequenze in uso per la telefonia cellulare (900 MHz, 1950 MHz), per cui la grandezza dosimetrica di riferimento sarà il SAR (Specific Absorption Rate, espresso in W/kg o

in mW/g), ovvero la potenza assorbita per unità di massa da un volume campione (coltura cellulare, tessuto, organo) per effetto dell'interazione con il campo elettromagnetico. Il SAR è formalmente definito come:

$$\text{SAR} = (\sigma/2\rho) \cdot (E^2)$$

dove σ e ρ sono, rispettivamente, la conducibilità, in S/m, e la densità di massa, in kg/m³, del materiale in cui avviene la deposizione di energia elettromagnetica, mentre E è il valore di picco, in V/m, del campo elettrico nel materiale. Il SAR è un parametro di particolare importanza, in quanto è ciò che in generale viene misurato sperimentalmente. Esso fornisce una misura della quantità di calore generata nel volume campione, dà un'idea della sollecitazione termica a cui il campione è sottoposto, ed è legato all'incremento termico indotto dal campo mediante la formula:

$$\text{SAR} = c \cdot (dT/dt)$$

dove c è il calore specifico del materiale, in kcal/kg-K, dT e dt sono, rispettivamente, l'incremento termico indotto dall'interazione con il campo e la durata dell'esposizione.

Quindi, il SAR rappresenta una grandezza dosimetrica fondamentale, che è valutata utilizzando metodi sia numerici sia sperimentali, sulla base di criteri di efficienza (rapporto tra il SAR medio e la potenza fornita all'applicatore) e di uniformità (in genere una deviazione standard dall'uniformità minore del 30% è considerata accettabile). I metodi numerici vengono applicati utilizzando specifici software che consentono di risolvere problemi elettromagnetici complessi in domini opportunamente definiti. I risultati della valutazione numerica vanno poi convalidati mediante opportune procedure sperimentali, che vanno a misurare la grandezza dosimetrica di interesse direttamente nel campione esposto (quando possibile). Tale operazione viene in genere eseguita mediante misure di SAR locale con metodi calorimetrici, che sfruttano cioè la definizione di SAR in termini di incremento termico. In genere vengono utilizzati sensori termici (termometri a fibra ottica, termocoppie), che consentono di valutare l'incremento di temperatura in un punto, per cui le misure vengono effettuate in più punti del campione, in modo da mappare la distribuzione spaziale di SAR. Oppure, è possibile utilizzare anche termocamere a raggi infrarossi, che consentono di valutare il pattern di riscaldamento della superficie superiore del campione.

Il SAR rappresenta, inoltre, il parametro di riferimento nelle normative internazionali riguardanti la definizione dei limiti di esposizione della popolazione e dei lavoratori ai campi elettromagnetici ad alta frequenza, e viene utilizzato per confrontare tra loro effetti biologici osservati in differenti condizioni di esposizione. Pertanto, risulta fondamentale, nell'ambito degli studi sulla valutazione degli effetti biologici dei campi elettromagnetici, caratterizzare e controllare in maniera accurata il pattern di deposizione dell'energia elettromagnetica all'interno dei campioni esposti, in modo tale da ottenere risultati affidabili e confrontabili.

L'incremento termico nel campione biologico indotto dall'interazione con la radiazione elettromagnetica è responsabile di una serie di effetti biologici ben noti e documentati in letteratura (effetti termici delle radiofrequenze). L'incremento di temperatura può indurre danni ad organi ed apparati, che possono anche essere irreversibili. In questo contesto i meccanismi di termoregolazione (macro e micro - circolazione), assumono un ruolo fondamentale nella difesa biologica degli organi esposti. Gli organi e gli apparati più sensibili agli incrementi di temperatura sono quelli

a ridotta o assente vascolarizzazione, quali il cristallino (perché totalmente privo di vascolarizzazione e per la sua disposizione anatomica superficiale) e le gonadi (scarsamente vascolarizzate) (Bongiorno et al., 1984; Pennarola, 1997). Per molto tempo si è ritenuto che l'unica conseguenza indotta da un campo elettromagnetico non ionizzante in un sistema biologico fosse un innalzamento della temperatura. Solo in un secondo momento l'interesse della comunità scientifica si è spostato verso lo studio di eventuali effetti biologici indotti da interazioni in cui l'incremento termico fosse nullo o comunque trascurabile (effetti non termici delle radiofrequenze). Gli effetti non termici consistono essenzialmente in interazioni a livello molecolare, il cui meccanismo di azione risulta ancora poco chiaro. Dato il carattere ubiquitario dell'esposizione ai campi elettromagnetici a RF, e le grosse incertezze riguardanti i possibili effetti associati a basse dosi di esposizione, lo studio degli effetti non termici riveste una particolare importanza da un punto di vista sia teorico che biofisico (Vecchia et al., 2009).

2.3 Valutazione degli effetti genotossici indotti da CEM non ionizzanti alle frequenze in uso per la telefonia cellulare

Tra i possibili effetti biologici indotti in un sistema cellulare, l'induzione di danno al DNA (effetti genotossici) ha sicuramente una grande rilevanza, data l'associazione di tali danni con l'insorgenza di tumori. Inoltre, è anche noto che danni indotti a carico del patrimonio genetico potrebbero avere conseguenze non soltanto per l'individuo esposto, ma anche per le generazioni successive (nel caso di cellule germinali).

Dai lavori di review sulla genotossicità delle RF pubblicati negli ultimi anni, emerge chiaramente che, sulla base dei risultati scientifici raccolti fino ad oggi, la radiazione a RF, in regime non-termico, non è direttamente mutagena, e che, nell'ambito dello studio degli effetti cooperativi, probabilmente non è in grado di incrementare la genotossicità di agenti fisici o chimici a nota azione genotossica (Maes et al., 1997; Meltz et al., 1989; Vijayalaxmi and Obe, 2004; Verschaeve, 2005; McNamee et al., 2002). D'altra parte, sono stati riportati anche risultati positivi, che, tuttavia, sono stati attribuiti ad effetti termici, o a possibili errori metodologici e ad una scorretta interpretazione dei dati. E' stata evidenziata anche la possibilità che le RF inducano deboli effetti sulla replicazione e/o trascrizione genica, ed alcuni nuovi studi (REFLEX 2004) hanno affermato l'esigenza di approfondimenti al riguardo. In generale, la comunità scientifica non ha ancora raggiunto un punto di vista condiviso sull'argomento (Vecchia et al., 2009).

Per quanto riguarda il possibile effetto cooperativo delle RF con agenti mutageni, di natura sia chimica sia fisica, nella maggior parte degli studi di co-esposizione non si evidenziava un incremento della frequenza di danno genetico rispetto alla trattamento con il mutagene da solo. Gli studi sono stati effettuati su diverse linee cellulari (cellule di ovaio di criceto cinese, cellule L5178Y, ecc.) ed utilizzando diversi test biologici (aberrazioni cromosomiche, scambi di cromatidi fratelli). Quando l'esposizione a RF avveniva prima dell'esposizione al mutagene, il danno genetico risultava, in alcuni casi, più alto rispetto a quello indotto dal solo mutagene (Maes et al., 1996; Scarfi et al., 1996; Zhang et al., 2002). Ad oggi, tuttavia, non c'è alcun criterio per stabilire che l'ordine dell'esposizione possa determinare la presenza o meno di un effetto cooperativo. Le differenze nei risultati ottenuti potrebbero essere dovuti a fattori che non sono stati tenuti in conto nel protocollo sperimentale.

In conclusione, si può osservare che ad oggi la maggior parte degli studi *in vitro* non hanno trovato evidenze di induzione di danno genetico da parte delle RF in regimi di esposizione non-termici, ed indicano che le RF non hanno un marcato effetto sinergico o additivo rispetto ad altri agenti ambientali (mutageni/carcinogeni). D'altra parte, la maggior parte degli studi si è focalizzata su endpoint genetici corrispondenti a generiche anomalie della struttura cromosomica, per cui è possibile che effetti indiretti e più blandi siano stati trascurati. Di conseguenza, è probabilmente necessario utilizzare metodi più sensibili, per determinare l'effettiva esistenza di questi effetti. Nuovi metodi, quale, ad esempio, la determinazione della proteina intranucleare γ -H2AX (foci), e l'analisi di mutazioni milli/micro satellite, potrebbero dimostrarsi più accurati nella valutazione del rischio genetico associate alle RF.

Queste conclusioni sono supportate da un recente meta-analisi sulla genotossicità delle RF (Vijayalaxmi and Prihoda, 2008). Gli autori hanno analizzato quantitativamente i risultati di 63 lavori pubblicati tra il 1990 ed il 2003, derivando indici ed intervalli di confidenza al 95% per vari endpoint genetici in relazione alla frequenza, al SAR ed all'esposizione in onda continua o pulsata. Gli indici globali di genotossicità ottenuti dai gruppi esposti alla RF e da quelli di controllo sono risultati simili. Inoltre, gli indici medi per le aberrazioni cromosomiche nei gruppi esposti, in quelli sham-esposti e nei controlli rientravano nei livelli spontanei riportati in database storici (Vecchia et al., 2009).

Recentemente, nel Maggio 2011, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato i campi elettromagnetici a RF come possibilmente carcinogeni per l'uomo (Gruppo 2.B) (Baan et al., 2011). L'IARC ha considerato la letteratura disponibile sulla carcinogenicità delle RF ed ha trovato un'evidenza limitata sulla base di associazioni positive tra glioma e neurinoma acustico con le esposizioni a lungo termine. Tuttavia, la conclusione dell'IARC era principalmente basata sui risultati di studi epidemiologici, dai quali è risultato un incremento del rischio di glioma per i soggetti esposti per lunghi periodi (30 minuti al giorno, su un periodo di circa 10 anni), ma non per esposizioni più blande.

Un ancor più recente lavoro di meta-analisi sulla genotossicità delle RF per l'uomo (Vijayalaxmi and Prihoda, 2012) ha però messo in evidenza che tali correlazioni positive tra esposizioni a RF e danni genotossici si ottengono quando tutti i lavori presenti in letteratura vengono considerati nell'analisi. Se, tuttavia, si considerano soltanto quei lavori condotti rispettando i requisiti di qualità del protocollo sperimentale (Good Laboratory Practices), da un punto di vista sia biologico, sia elettromagnetico, tale correlazione positiva viene meno. Risulta evidente, quindi, la necessità di rispettare, nell'ambito della sperimentazione sugli effetti biologici dei campi elettromagnetici a RF, criteri di qualità tali da rendere lo studio stesso accurato, ed i risultati attendibili e confrontabili con altri studi condotti con gli stessi criteri.

Nel seguito, tali requisiti sperimentali saranno brevemente mostrati in riferimento agli studi *in vitro*.

2.4 Requisiti sperimentali per studi *in vitro* rivolti alla valutazione degli effetti biologici delle RF

Per poter condurre studi *in vitro* sulla valutazione degli effetti biologici delle RF, in termini di effetti genotossici e non, è necessario che siano rispettati requisiti sperimentali biologici ed elettromagnetici.

2.4.1 Requisiti biologici

Secondo le linee guida "Good Cell Culture Practice" (Hartung et al., 2002), il mantenimento di elevati standard di qualità è fondamentale per qualsiasi pratica scientifica, ed è essenziale per garantire la riproducibilità, affidabilità, credibilità ed opportuna applicazione di qualsiasi risultato. E' richiesta la standardizzazione della coltura cellulare, ottenuta controllando i materiali (ad esempio, il mezzo di coltura) che interagiscono con il sistema biologico e ne determinano le proprietà. Si raccomanda che stock autentici di linee cellulari continue vengano acquistati da banche cellulari riconosciute a livello nazionale e/o internazionale.

E' possibile utilizzare un'ampia varietà di tipi cellulari, che devono essere utilizzati per specifici approcci sperimentali e per l'identificazione di specifici effetti biologici, sulla base del target cellulare da studiare. Ad esempio, i linfociti umani sono ampiamente utilizzati, poiché sono di origine umana e si possono facilmente ottenere tramite prelievi di sangue periferico. Essi rappresentano uno dei principali modelli cellulari per lo studio degli effetti genotossici di agenti chimici e fisici, inclusi i campi elettromagnetici.

Un requisito generale affinché un esperimento *in vitro* sia ben progettato e caratterizzato è la messa a punto di campioni di controllo. Infatti, l'utilizzo di controlli negativi e positivi fornisce una garanzia sul controllo delle condizioni sperimentali, a cui si aggiungono, nell'ambito degli studi di bioelettromagnetismo, i campioni sham-esposti, ovvero campioni di controllo che vengono posti nelle stesse condizioni ambientali dei campioni esposti, con la sola differenza che l'esposizione al campo non viene effettuata. I campioni sham-esposti rappresentano il vero controllo, in quanto tengono conto del microambiente, all'interno del sistema di esposizione, che potrebbe influenzare l'endpoint cellulare sotto indagine.

E' inoltre, fondamentale effettuare esperimenti "in cieco", ovvero utilizzando campioni codificati, il cui tipo di trattamento (esposizione, controllo, sham-esposizione) rimanga incognito fino al completamento dell'analisi dei dati. Questo aspetto è di cruciale importanza per limitare i bias sperimentali, e per consentire il confronto dei risultati di laboratori diversi, specialmente nelle condizioni in cui ci si aspettano delle piccole variazioni, come nel caso dell'esposizione a RF.

L'analisi dei risultati è un altro aspetto molto delicato degli studi *in vitro*. La scelta del test statistico dipende dall'obiettivo dello studio, dal design sperimentale e dalla natura dei dati inoltre, bisogna che tenga conto della variabilità biologica e dell'errore di misura. In genere, per una valutazione quantitativa dei risultati, i dati sono forniti in termini di media e deviazione standard, come misura della variabilità sperimentale. I test statistici sono poi applicati per verificare se le medie, o le distribuzioni di gruppi associati a diversi trattamenti differiscono tra loro. Infine, l'entità di un qualsiasi effetto significativo deve essere sempre fornita con un intervallo di confidenza, la deviazione standard o l'errore standard in modo da fornire una stima della precisione del risultato. Vale la pena di sottolineare che, in alcuni casi, un effetto

che risulti significativo da un punto di vista statistico, potrebbe non esserlo dal punto di vista biologico. D'altra parte, l'assenza di significatività statistica non è sufficiente per affermare l'assenza di effetto, ma, il più delle volte, è dovuta al fatto che il campione considerato è troppo piccolo, o che il materiale sperimentale è eccessivamente variabile. In questi casi, un'analisi della potenza del test può aiutare nel verificare la sensibilità del test da applicare, ovvero l'entità minima di effetto biologico che il test è in grado di apprezzare. In generale, una valutazione bilanciata, che tenga conto sia dei risultati statistici, sia di quelli biologici, è fondamentale per la definizione di valide conclusioni.

2.4.2 Requisiti elettromagnetici

Nell'ambito della valutazione degli effetti biologici indotti da campi elettromagnetici a RF in colture cellulari *in vitro*, un ruolo fondamentale è rivestito dal sistema di esposizione, che va progettato e realizzato seguendo dei criteri ben precisi di efficienza ed accuratezza, in modo da consentire condizioni di esposizione ben definite e controllate, e tali da fornire risultati riproducibili e scientificamente validi. Questo aspetto è stato stressato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità ("Health and environmental effects of exposure to static and time varying electric and magnetic fields: guidelines for quality research, " WHO, Geneva, Switzerland, 1996. (Online). Available at: www.who.int/peh-emf/research_database/en/index, WHO Int. EMF Project.), che ha evidenziato l'importanza degli studi dosimetrici nell'ambito della valutazione degli effetti biologici delle RF.

I sistemi di esposizione usati nella ricerca bioelettromagnetica non sono stati standardizzati in maniera univoca, in quanto gli stessi test biologici ed i protocolli sperimentali presentano notevoli differenze. Tuttavia, esistono delle linee guida e requisiti minimi pubblicati in letteratura che suggeriscono metodi e procedure da seguire nel progetto e nella realizzazione dei sistemi di esposizione tali da perseguire la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati (Chou et al., 1996, Kuster et al., 2001, Shuderer et al., 2004, Paffi et al., 2010).

In generale, il progetto e la realizzazione di un sistema di esposizione a RF per esperimenti di bioelettromagnetismo sono guidati da ipotesi di lavoro di natura sia elettromagnetica, sia biologica. Innanzitutto, occorre definire le condizioni elettromagnetiche da riprodurre (frequenza, schema di modulazione, livello di SAR nel campione, polarizzazione del campo elettromagnetico rispetto al campione, durata dell'esposizione), ed il protocollo biologico da seguire (numero di campioni da esporre contemporaneamente, test biologico da effettuare in tempo reale o in tempo ritardato rispetto all'esposizione). Tutte queste condizioni sono rilevanti rispetto alla scelta delle soluzioni hardware e software da implementare nel set up sperimentale.

Un tipico sistema di esposizione a RF per esperimenti *in vitro* è costituito dai seguenti elementi di base:

- una sorgente a RF, che consente di definire le principali caratteristiche del segnale (frequenza, modulazione, potenza);
- componenti attivi e/o passivi per il condizionamento del segnale (amplificatori, accoppiatori, divisori);
- componenti per il monitoraggio del segnale (misuratori di potenza, PC per il controllo da remoto);
- applicatore a RF, ovvero la struttura che consente la propagazione guidata del campo elettromagnetico (guide d'onda, celle TEM, wire patch cells), e nella

- quale, in genere, vengono posizionati i campioni da esporre
- componenti per il monitoraggio dei parametri biologici ed ambientali (temperatura, umidità, CO₂).

Per un'opportuna scelta dei componenti indicati nell'elenco precedente, è opportuna una stretta collaborazione tra ingegneri e biologi, in modo da tenere conto di tutti i requisiti, sia elettromagnetici, sia biologici richiesti dall'esperimento. Infatti, un sistema per esposizioni *in vitro* deve anche rispettare i requisiti minimi per il mantenimento delle colture cellulari (temperatura, pH, concentrazione, umidità, ecc.). Ciò può essere ottenuto, ad esempio, realizzando il sistema di esposizione in modo tale che possa essere inserito all'interno di un comune incubatore per colture cellulari, garantendo in tal modo anche la possibilità di effettuare esposizioni prolungate in un ambiente idoneo al mantenimento delle condizioni ambientali. Le colture cellulari vengono poi ospitate all'interno di specifiche piastre il che, deve essere considerato nella scelta dell'applicatore a RF che deve tener conto dell'efficienza di volume dell'esposizione, ovvero del rapporto tra l'area (per cellule adese) o il volume (per cellule in sospensione) del campione e lo spazio richiesto dall'intera unità di esposizione. Tale rapporto è critico perché, se l'efficienza è bassa, il set up di esposizione non può essere inserito nell'incubatore, e quindi richiederà ulteriori sforzi, e costi, per il mantenimento delle condizioni ambientali. D'altro canto, il sistema di esposizione deve anche garantire condizioni di esposizioni uniformi e ben definite per l'intera popolazione cellulare. A tal proposito, molto importante è l'analisi dosimetria che ha lo scopo di valutare la quantità e la distribuzione di energia elettromagnetica assorbita da un campione biologico esposto, quando sono note le caratteristiche del campo elettromagnetico incidente (frequenza, polarizzazione, modulazione), le proprietà fisiche ed elettromagnetiche (densità di massa, permittività dielettrica, conducibilità) dei materiali, e le condizioni ambientali in cui avviene l'esposizione. La dosimetria elettromagnetica rappresenta, dunque, uno strumento imprescindibile per la definizione di sistemi di esposizione a RF che consentano di eseguire esperimenti di bioelettromagnetismo secondo canoni di qualità ed affidabilità.

CAPITOLO 3**Metodi d'indagine impiegati per la valutazione
dell'induzione di effetti genotossici e citotossici****3.1 Indicatori citogenetici di genotossicità**

Per valutare i possibili danni a carico del corredo cromosomico esistono diversi metodi. Tra questi i più usati sono:

- Aberrazioni cromosomiche (AC);
- Scambi intercromatidici (SCE);
- Micronuclei (MN).

Le AC possono derivare: (a) da un danno diretto al DNA (meccanismo d'azione tipico, ad esempio, delle radiazioni ionizzanti); (b) dalla replicazione di un DNA stampo danneggiato (meccanismo proprio di agenti clastogeni); (c) dall'inibizione o interferenza con la sintesi del DNA (meccanismo che si presenta in caso di esposizione ad agenti intercalanti). Il test delle AC viene generalmente eseguito su cellule proliferanti bloccate in metafase mediante aggiunta di colchicina, un inibitore della polimerizzazione della tubulina e quindi del fuso mitotico. Le AC sono ormai da tempo riconosciute come un valido biomarcatore di esposizione ad agenti genotossici fisici e chimici. Un'elevata frequenza di aberrazioni cromosomiche strutturali è associata un aumento del rischio d'insorgenza di tumori (Hagmar et al., 1994; Bonassi et al., 1995, 2000).

Gli scambi tra cromatidi fratelli, (Sister Chromatid Exchange, SCE), rappresentano lo scambio reciproco di DNA tra i loci omologhi di due cromatidi fratelli di un cromosoma replicato. Il significato biologico degli SCE è incerto: essi si verificano spontaneamente nelle cellule, ma la loro frequenza dipende dal tipo di organismo, dal tipo di tessuto, dal tipo di cellula e dalle condizioni sperimentali che vengono utilizzate.

Nelle cellule eucariotiche la frequenza di SCE aumenta in seguito ad esposizione ad agenti che inducono addotti e cross-links o che interferiscono con la replicazione del DNA. Agenti genotossici in grado di provocare un aumento della frequenza degli SCE sono i raggi X, UV, la nicotina e l'alcool (Wojcik et al., 2004).

Di seguito viene approfondito il test del micronucleo.

3.1.1 Test del micronucleo

Il test del micronucleo (MN) attualmente costituisce una valida alternativa ai saggi di citogenetica tradizionale per evidenziare danni al corredo cromosomico in cellule di mammifero, *in vitro* e *in vivo* (Huber e Bauchinger, 1996). Esso rappresenta un indicatore indiretto di aberrazioni cromosomiche numeriche o strutturali oppure di alterazioni a carico del fuso mitotico.

I micronuclei (MN) si formano al termine di una divisione cellulare dalla condensazione di frammenti acentrici di cromosomi o di cromosomi interi che hanno perso l'affinità del centromero per il fuso mitotico, per cui vengono esclusi dal nucleo

principale. Si originano così, nella cellula in interfase, corpuscoli intracitoplasmatici liberi, di forma tondeggianti, chiaramente distinti dal nucleo principale, rispetto al quale hanno la stessa colorazione ma dimensioni nettamente inferiori (da 1/3 a 1/16 del nucleo principale). Risulta, quindi evidente che i MN possono essere evidenziati solo in cellule che hanno compiuto un ciclo cellulare.

In una popolazione cellulare proliferante l'incidenza di MN come conseguenza dell'esposizione ad un mutageno è difficile da stabilire, a causa della presenza in coltura di cellule che non si sono divise, quindi non hanno espresso il danno eventualmente indotto da un trattamento chimico o fisico, o di cellule che si sono divise più di una volta.

Per ovviare a questo limite, Fenech e Morley nel 1986, hanno proposto, sui linfociti umani, una tecnica di blocco della citodieresi mediante l'uso di Citocalasina-B, un metabolita prodotto da *Helminthosporium dematioideum* che, depolimerizzando i filamenti di actina inibisce l'organizzazione del citoscheletro, producendo il blocco della citodieresi senza però interferire con la divisione nucleare. Si genera in tal modo una popolazione di cellule binucleate nelle quali viene effettuata la conta dei MN, in accordo con i criteri riportati di seguito (Fenech, 2007):

- le cellule binucleate (CB) devono avere la membrana citoplasmatica integra;
- i due nuclei delle CB devono essere di dimensioni confrontabili;
- le CB non devono contenere più di sei MN;
- i MN devono essere morfologicamente simili ai nuclei ma con dimensioni minori, con diametro compreso tra 1/16 e 1/3 di quello dei nuclei principali;
- i MN devono avere la stessa colorazione dei nuclei principali;
- i MN non devono essere collegati ai nuclei principali attraverso ponti nucleoplasmatici.

L'impiego della Citocalasina-B consente inoltre di calcolare in maniera semplice l'indice di proliferazione. Infatti, poichè la proliferazione di una coltura non è sincrona, oltre a cellule binucleate si riscontrano anche cellule mononucleate (che non si dividono) e plurinucleate (con 3 o 4 nuclei, che cioè si sono divisi più di una volta). In accordo con quanto riportato da Surrales et al. (1995), si può calcolare l'indice di proliferazione (IP) come segue:

$$IP = [M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4)] / N$$

dove M1-M4 rappresentano il numero di cellule con 1 - 4 nuclei, rispettivamente ed N è il numero totale di cellule esaminate.

In figura 3.1, si riporta una rappresentazione schematica della duplicazione cellulare in presenza di Citocalasina-B.

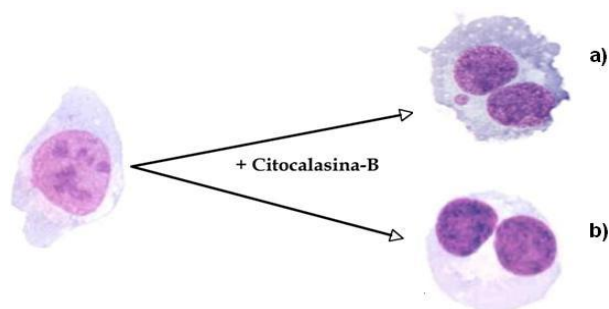


Figura 3.1 - Rappresentazione schematica della duplicazione cellulare in presenza di Citocalasina-B, che origina cellule binucleate a) con MN o b) senza MN.

Il test del micronucleo col blocco della citodieresi (Cytokinesis-block Micronucleus Assay, CBMN) presenta una maggiore sensibilità, e quindi offre una maggiore precisione rispetto ai test convenzionali. Il motivo del suo successo va pertanto ricercato nelle considerazioni che seguono:

1. l'analisi dei MN è relativamente più semplice e più rapida dello screening delle aberrazioni cromosomiche e degli scambi intercromatidici e quindi consente in tempi più rapidi di effettuare lo screening di migliaia di cellule, conferendo maggiore validità statistica ai risultati ottenuti;
2. i MN persistono per un periodo di tempo abbastanza lungo dopo la loro formazione, per cui possono essere evidenziati nella discendenza che non si è divisa delle cellule proliferanti;
3. il test fornisce informazioni sia sul danno cromosomico diretto sia sulle alterazioni a carico del fuso mitotico.

L'osservazione e la quantizzazione dei MN può essere effettuata, oltre che nei linfociti, in vari tipi cellulari in coltura, ma a questo scopo è necessario valutare i tempi di duplicazione cellulare per una corretta applicazione del metodo (Kirsch-Volders et al., 2003). A seconda del tipo di insulto, della sua entità e durata, il destino della cellula varia: questa può subire un danno e ripararlo immediatamente, oppure completare un ciclo mitotico e, eventualmente, esprimere uno o più MN, fino ad andare in apoptosi. Un incremento della frequenza di MN in tali cellule indica un aumentato rischio di cancro, e potrebbe essere un utile indicatore per monitorare o predire l'efficacia di strategie terapeutiche.

3.1.2 Il linfocita quale dosimetro biologico

Il linfocita, cellula chiave per le risposte immunitarie, è un dosimetro biologico ideale in quanto:

1. si tratta di cellula che circola in tutto l'organismo, cioè lascia il sangue, attraversa organi e tessuti linfatici, e rientra nel sangue; sicché il linfocita può

- percepire e registrare l'insulto genotossico ricevuto dai vari distretti dell'organismo;
2. è una cellula facilmente reperibile, può essere tenuta in coltura, per cui si presta bene a studi *in vitro*;
 3. il linfocita "memorizza" il contatto, e può esprimere le "conoscenze" acquisite dopo attivazione *in vitro*.

I linfociti umani sono il più diffuso tipo cellulare impiegato per la valutazione degli effetti genotossici mediante i test sopra descritti, incluso il test del MN. Infatti, sono cellule circolanti che si ottengono da un prelievo di sangue periferico. Inoltre, presentano un alto rapporto nucleo/citoplasma che facilita l'individuazione dei MN al loro interno. Infine, tutti i saggi di citogenetica sono stati messi a punto su colture di linfociti umani, quindi i protocolli sperimentali sono ben standardizzati. La frequenza di MN nei linfociti umani è in media 7.8 ± 5.2 ("range" compreso tra 3 e 25) per 1000 cellule analizzate ed è fortemente influenzata da sesso ed età del soggetto, con un incremento medio di 0.17 MN/anno (Surralles et al., 1997).

3.2 Apoptosi

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è un processo attivo che conduce all'eliminazione di una cellula bersaglio senza indurre una risposta infiammatoria (diversamente da quanto avviene per la necrosi). La cellula è condensata in "corpi apoptotici", che vengono prontamente rimossi dal sistema macrofagico. Attraverso l'apoptosi, gli organismi multicellulari rimodellano i tessuti durante l'embriogenesi, regolano il turnover cellulare, prevengono le trasformazioni neoplastiche delle cellule danneggiate ed eliminano quelle infettate. Un alterato funzionamento dei processi di morte cellulare programmata può avere importanti conseguenze sulla crescita dell'individuo, sui tumori e sulle malattie neurodegenerative.

L'apoptosi può essere indotta da stimoli di varia natura, sia esterni alla cellula (fattori di crescita, citochine) che interni ad essa (danni al DNA). Segnali di apoptosi a origine intra e/o extracellulare vengono trasmessi attraverso diversi percorsi fino ad un passaggio comune, cui consegue l'esecuzione del programma di morte con l'attivazione di una cascata di eventi regolata dalle CASPASI cioè da PROTEASI che tagliano proteine bersaglio in corrispondenza di residui dell'acido aspartico in modo irreversibile

L'apoptosi è dunque, un meccanismo complesso che comporta modificazioni morfologiche e biochimiche che si possono distinguere in tre fasi:

- 1) la fase di iniziazione in cui le cellule ricevono lo stimolo;
- 2) la fase di esecuzione associata a cambiamenti morfologici modificazioni della membrana plasmatica con cambiamento di distribuzione di fosfolipidi quali la FOSFATIDILSERINA, che trasloca dalla parte citoplasmatica alla parte extracellulare della membrana plasmatica. Inoltre, si verifica la polarizzazione della membrana mitocondriale e l'attivazione delle caspasi;
- 3) la fase di degradazione con condensazione della cromatina e formazione di corpi apoptotici.

Subentra infine, un fenomeno di fagocitosi seguito da necrosi secondaria.

In figura 3.2 si riporta una rappresentazione schematica delle principali tappe del processo apoptotico.

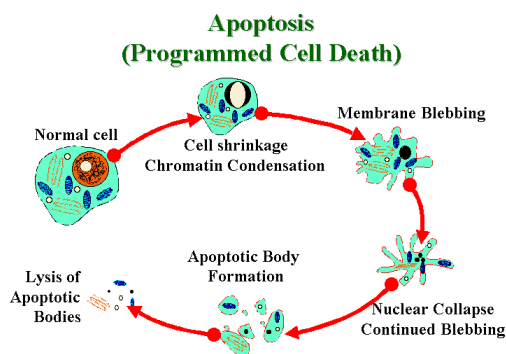


Figura 3.2 - Apoptosi

Parallelamente ai cambiamenti morfologici, la cellula subisce anche modificazioni biochimiche e funzionali e sulla base di queste specifiche caratteristiche sono state proposte diverse tecniche per il riconoscimento delle cellule apoptotiche.

Tra queste, la citofluorimetria a flusso è una tecnica quantitativa che consente di ricavare una stima della frequenza di apoptosi su un vasto numero di cellule e di discriminare le cellule apoptotiche da quelle non apoptotiche (o necrotiche) tramite valutazione delle loro caratteristiche fisiche intrinseche, o della quantità di fluorescenza emessa dai fluorocromi usati per colorare le cellule stesse.

In particolare, per determinare la morte cellulare, si utilizzano due diversi fluorocromi: Annessina V-FITC e ioduro di propidio (PI) (Vermes et al., 1995). In questo saggio si sfrutta la capacità dell'Annessina, proteina calcio dipendente, di legarsi alla fosfatidilserina e dare così fluorescenza nel verde grazie al fluoroforo coniugato (FITC, fluoresceina isotiocianato). Ma tale legame può avvenire anche in assenza di apoptosi, poiché durante la necrosi si ha rottura della membrana plasmatica e l'annessina può legarsi alla PS penetrando tra i pori della membrana non più integra. Quindi viene aggiunto un altro fluoroforo che permetta di verificare l'integrità della membrana. A questo scopo si utilizza lo ioduro di propidio, che si intercala al DNA stechiometricamente e fluoresce nel rosso nel caso in cui la membrana cellulare non sia integra. Le cellule che risulteranno negative sia all'annessina che allo ioduro di propidio saranno cellule vive; le cellule positive all'annessina e negative allo ioduro di propidio saranno cellule in fase precoce di apoptosi; le cellule negative all'annessina e positive allo ioduro di propidio saranno cellule necrotiche in quanto ci sarà solamente rottura della membrana plasmatica; le cellule positive all'annessina e positive allo ioduro di propidio saranno invece cellule o in fase avanzata di apoptosi o cellule necrotiche (figura 3.3).

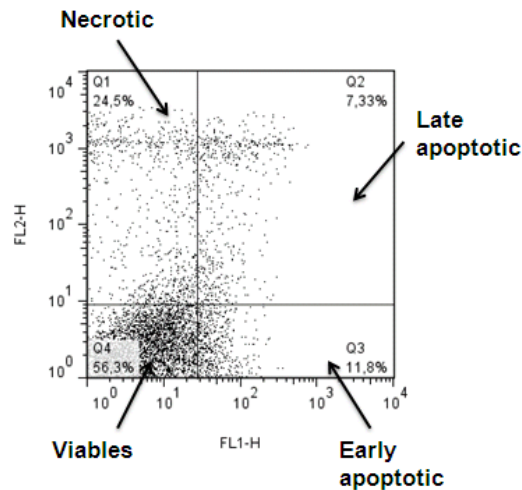


Figura 3.3 - Dot plot di una popolazione linfocitaria marcata con AnxV-FITC/PI per l'analisi dell'apoptosi.

3.3 Ciclo cellulare

Il periodo che intercorre fra l'origine di una cellula e la sua duplicazione è definito ciclo cellulare. Tale ciclo comprende 4 fasi, nel corso delle quali una cellula si sviluppa, replica i propri costituenti molecolari e infine si divide in due cellule figlie.

L'intero ciclo ha una durata che varia da alcune ore a qualche giorno, in rapporto al tipo cellulare considerato.

Le 4 fasi del ciclo cellulare sono:

- fase G1 (Gap 1, intervallo prima della Fase S)
- fase S (Sintesi)
- fase G2 (Gap 2, secondo intervallo)
- fase M (Divisione Mitotica)

} **Interfase**

Per la maggior parte dei costituenti cellulari il processo di replicazione non ha bisogno di essere esattamente controllato ma è sufficiente che, in un ciclo cellulare, il loro contenuto sia approssimativamente raddoppiato e che la cellula madre distribuisca a ogni cellula figlia quote approssimativamente uguali. La molecola di DNA rappresenta però un'eccezione, infatti, questa molecola deve essere sempre replicata esattamente e ripartita con precisione tra le due cellule figlie. Durante la duplicazione le cellule normali diploidi passano attraverso le quattro fasi: G1, S, G2,

M. Le cellule normali non replicanti sono invece definite cellule quiescenti e si trovano nella fase G₀ del ciclo, come nel caso dei linfociti circolanti. La fase G₁ è caratterizzata da un'elevata crescita citoplasmatica e un'elevata sintesi proteica. La durata di questa fase oscilla da 6 a 12 ore. La fase S inizia, quando comincia la sintesi del DNA e termina, quando è raddoppiato il contenuto di DNA nel nucleo e sono stati duplicati i cromosomi. La durata della fase S è di circa 6-8 ore. La cellula entra poi in fase G₂, che inizia, quando la replicazione è completata e continua fino all'inizio della mitosi. La durata di questa fase è di circa 4 ore. L'ultima è la fase M, che corrisponde alla mitosi, durante la quale la cellula si divide in due cellule figlie, ciascuna delle quali possiede un quantitativo di DNA pari a quello originario. Questa fase è la più breve, infatti, la sua durata è di circa 1 ora.

La progressione attraverso il ciclo cellulare e' regolata da una serie di fattori genetici e biochimici: i meccanismi di base che controllano la divisione cellulare sono di tipo genetico; su questi possono agire fattori interni od esterni (fattori di crescita) in grado di modificare la progressione delle cellule attraverso il ciclo di divisione cellulare. Esistono dei punti di controllo, dove è possibile bloccare il ciclo cellulare in una determinate fase (figura 3.4). Questi sono:

- transizione G₁ --> S inizio della replicazione del DNA;
- transizione G₂ --> M inizio della mitosi;
- transizione M --> G₁.

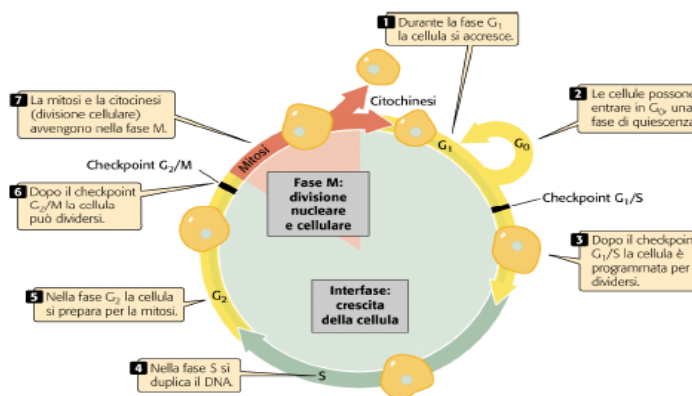


Figura 3.4 - Fasi del ciclo cellulare.

Un'alterata regolazione del ciclo cellulare per una modificazione di una delle proteine coinvolte nel controllo del ciclo, puo' generare il cancro.

L'analisi del ciclo cellulare viene effettuata mediante diverse tecniche, tra cui la misura citofluorimetrica del contenuto di DNA, che offre due informazioni. La prima di tipo citogenetico, la seconda di tipo cinetico. Con una misura del contenuto di DNA per cellula possiamo stabilire il grado di ploidia per singola cellula (informazioni citogenetiche). Possiamo inoltre, determinare con esattezza come sono distribuite le

cellule nelle varie fasi del ciclo ed avere quindi informazioni sullo stato cinetico o proliferante del tipo cellulare in esame (informazioni cinetica).

Una tecnica rapida e affidabile è la marcatura con ioduro di propidio (PI), un fluorocromo che viene eccitato dalla radiazione laser a 488 nm ed emette nel campo del rosso, intorno a 617 nm. Il PI si lega stechiometricamente al DNA e viene incorporato dalle cellule in modo proporzionale al loro contenuto di DNA. Dalla misura al citofluorimetro si ottiene un segnale la cui intensità è proporzionale alla quantità di DNA della cellula, e in base al contenuto di DNA è possibile stabilire in quale fase del ciclo essa si trovi. Le cellule in fase S, che hanno un contenuto di DNA maggiore di quelle in fase G1, emetteranno un segnale di ampiezza maggiore, le cellule che si trovano in fase G2, che hanno un contenuto di DNA doppio rispetto a quelle in fase G1, emetteranno un segnale di fluorescenza approssimativamente doppio rispetto a quelle in fase G1.

Dall'analisi dell'istogramma dell'intensità di fluorescenza, dove sull'asse delle ascisse si riporta l'intensità del segnale, proporzionale al contenuto di DNA delle cellule, e sull'asse delle ordinate il numero di cellule corrispondenti, è possibile distinguere le 3 fasi del ciclo: G1, S, G2/M come riportato in figura 3.5.

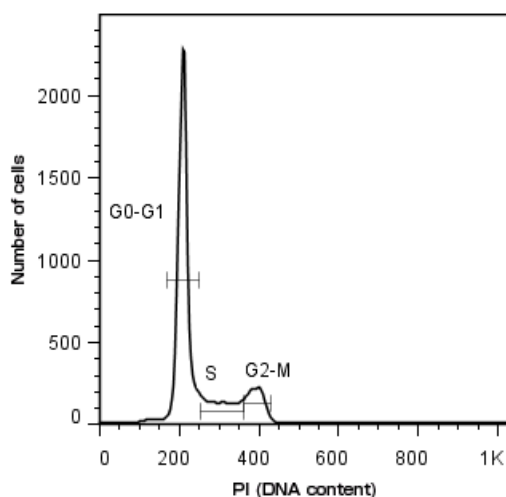


Figura 3.5 - Istogramma della distribuzione del contenuto di DNA ottenuto al citofluorimetro mediante marcatura con PI.

In condizioni ideali, l'istogramma dovrebbe essere costituito da due picchi, uno in corrispondenza dell'intensità di fluorescenza emessa dalle cellule in fase G1, che hanno tutte lo stesso contenuto di DNA, e l'altro in corrispondenza dell'intensità di fluorescenza, doppia rispetto alla prima, emessa dalle cellule in fase G2/M.

CAPITOLO 4

Materiali e Metodi

4.1 Colture cellulari

Sono state utilizzate colture cellulari primarie umane (linfociti) e stabilizzate di roditore (V79). Tutti i reagenti sono stati forniti dalla BioWhittaker, mentre la plastica sterile è stata acquistata alla Falcon.

Colture di linfociti umani

Campioni di sangue periferico da 27 donatori sani d'età compresa tra 20 e 40 anni, non fumatori che non erano stati esposti a mutageni chimici o fisici per motivi occupazionali, terapeutici o diagnostici, sono stati utilizzati per allestire colture di linfociti da sangue intero o isolati da buffy coat.

Le colture da sangue intero sono state allestite in capsule Petri da 35 mm, con 0.3 ml di sangue intero e 2.7 ml di terreno di coltura (RPMI 1640) addizionato con siero fetale bovino (FBS, 15%) e L-glutammina (LG, 1%). In accordo con i protocolli standard, è stata utilizzata fitoemoagglutinina (PHA, 1%) come mitogeno per stimolare i linfociti ad entrare in divisione.

I Buffy coat, un concentrato di piastrine e linfociti, sono stati ottenuti dall'ospedale San Paolo di Napoli in forma anonima e previo consenso informato da donazioni di sangue. I linfociti sono stati isolati mediante centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, AXIS-Shield): il sangue, diluito 1:2 in RPMI, è stato stratificato su 3 ml di Lymphoprep e centrifugato per 30 min. a 2100 g. I linfo/monociti localizzati all'interfaccia tra Lymphoprep e plasma sono stati recuperati, lavati per 2 volte in Phosphate Buffered Saline (PBS) e sospesi in RPMI assoluto. Le cellule ottenute dalla separazione sono state diluite in Trypan blue e contate alla camera di Burker per allestire colture seminando 2×10^6 di linfociti isolati (IL) in terreno completo.

Colture di V79

Fibroblasti di polmone di criceto (V79, Sigma) sono stati coltivati in terreno completo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con l'aggiunta di 10% FBS, 1% L-G e 1% Penicillina-Streptomina a 37°C in incubatore al 5% di CO₂ fino ad un massimo di 16 passaggi.

Per gli esperimenti, sono state allestite colture da 3 ml con 1.5×10^5 cellule in capsule Petri da 35 mm.

4.2 Trattamenti con Mitomicina-C (MMC)

La MMC è un agente alchilante bifunzionale aspecifico, cross-linkante che induce cross-link alla molecola di DNA.

E' stata preparata una soluzione di MMC 0,25 mg/ml (Sigma) in acqua distillata, congelata e conservata per non più di 6 settimane. Al momento dell'uso, la soluzione è stata diluita opportunamente per eseguire i trattamenti, come riportato di seguito.

Quando le colture di linfociti umani sono state trattate con dosi adattanti di MMC è stata somministrata una dose di 1 ng/ml 24 ore dopo la stimolazione con

PHA. La dose challenge impiegata era di 100 ng/ml, somministrata 48 h dopo la stimolazione. Questo protocollo è stato impiegato sia per le colture da sangue intero sia per quelle da linfociti separati.

Nelle V79 sono state impiegate due dosi challenge di 333 e 500 ng/ml, somministrate dopo 32 ore di crescita.

4.3 Trattamenti con 3 Aminobenzamide (3AB)

La 3AB, un inibitore della Poli-AD-polimerasi (PARP) è stata impiegata per valutare il coinvolgimento degli enzimi di riparo del DNA nell'induzione di RA. In entrambe i tipi cellulari è stata somministrata una dose sub-tossica di 2mM, contemporaneamente al trattamento con la dose challenge di MMC (48 h e 32 h dopo la semina per i linfociti umani e le V79, rispettivamente).

4.4 Esposizioni a raggi X

I raggi X interagiscono a livello cellulare inducendo modificazioni biochimiche che causano danni al DNA (mutazioni genetiche e danno cromosomico) che possono essere prodotti direttamente dalla radiazione incidente (75% di danno) o indirettamente, dalla generazione di radicali liberi.

Le esposizioni sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze Fisiche dell'Università Federico II di Napoli. E' stata impiegata una macchina a raggi X (Stabilipan 2, Siemens, Germany, figura 4.1) operante ad una tensione costante di 120 KVp e una corrente anodica di 20 mA ad un dose-rate di $0,75 \text{ Gy min}^{-1}$ per le dosi di 1 e 1,5 Gy, e $0,045 \text{ Gy min}^{-1}$ per la dose di 1 cGy. La dosimetria è stata eseguita prima e controllata durante l'irradiazione mediante una camera di ionizzazione cilindrica connessa ad un elettrometro posto in prossimità delle capsule di Petri.



Figura 4.1 – Espositore a raggi X e postazione di controllo.

Per la sperimentazione sono state eseguite esposizioni alla dose di 1 cGy (dose adattante) e di 1 o 1,5 Gy (dose challenge). Queste dosi sono state scelte sulla base di dati di letteratura (Mortazavi et al., 2006).

4.5 Esposizioni a radiofrequenza

Sistema a 900 MHz, segnale GSM

Il sistema di esposizione utilizzato impiega la Wire Patch Cell (WPC) come applicatore. La WPC è una struttura radiante composta da due piastre parallele ($15 \times 15 \times 2,9 \text{ cm}^3$) cortocircuitate in corrispondenza dei quattro angoli da cilindretti di rame, in grado di ospitare simultaneamente quattro capsule Petri del diametro interno di 3,5 cm. L'applicatore è stato caratterizzato mediante dosimetria numerica (codici di calcolo dedicati) e sperimentale (misura termica) in modo da determinare l'efficienza (SAR medio per unità di potenza incidente) e la distribuzione (coefficiente di variazione = deviazione standard / SAR medio) di SAR all'interno dei campioni. Sulla base di tali valutazioni il sistema è stato configurato in modo da avere un'efficienza di $0.35 \pm 0.10 \text{ (W/kg)/W}$ e una uniformità del 90%. Il sistema di esposizione, descritto in dettaglio in lavori precedenti (Scarfi et al., 2006; Palumbo et al., 2008; Sannino et al., 2009 b; Sannino et al., 2011) è mostrato in figura 4.2. In breve, due WPC, protette da una griglia metallica per evitare interferenze con il sistema elettrico dell'incubatore, sono poste in un incubatore standard per colture cellulari (Forma Scientific) e alimentate in accordo con lo schema di Figura 4.3. Una WPC era usata per l'esposizione al SAR di 1.25 W/Kg mentre l'altra per le sham esposizioni (SAR 0 W/kg). La temperatura di $36.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ era mantenuta costante all'interno dei campioni esposti mediante circolazione forzata d'acqua ($T^\circ = 36.7^\circ\text{C}$) in due avvolgimenti a spirale posizionati sulle facce esterne di ogni WPC. La temperatura era sempre monitorata e registrata durante gli esperimenti in capsule di Petri riempite con solo RPMI, mediante un termometro a fibra ottica (Fiso UMI 4, Tecnologie Fiso).



Figura 4.2 - WPC che alloggia quattro capsule di Petri (a); griglia metallica che schermata la WPC (b); sistema di esposizione alloggiato in un incubatore per colture cellulari (c).

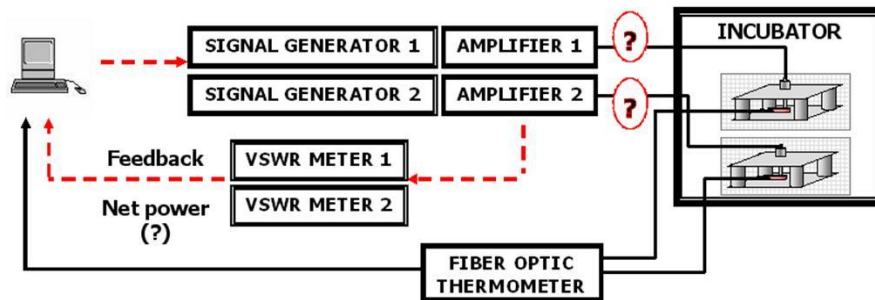


Figura 4.3 - Rappresentazione schematica del set-up di esposizione. Il segnale, emesso dai generatori viene amplificato e inviato alle WPC mediante un cavo coassiale. I valori di SAR sono mantenuti costanti durante l'esposizione mediante un controllo a feedback tramite PC.

Sistema a 1950 MHz, segnale UMTS

Il sistema, realizzato e caratterizzato in collaborazione con il dipartimento di Scienze Fisiche dell'Università degli studi di Napoli Federico II, utilizza la guida d'onda cortocircuitata come applicatore ossia un tubo metallico cavo di sezione rettangolare (WR 430: 109.2mm x 54.6 mm) chiuso mediante una lamina di alluminio. L'applicatore è stato caratterizzato mediante dosimetria numerica e sperimentale in modo da determinare l'efficienza e la distribuzione di SAR all'interno dei campioni. Sulla base di tali valutazioni è stata identificata la configurazione di campo elettrico parallelo alla superficie maggiore del campione, al fine di avere un'elevata efficienza (fino a 80 %) ed una limitata disuniformità di SAR (meno del 30 %) (Calabrese et al., 2006). Il sistema di esposizione, descritto in lavori precedenti (Sannino et al., 2006, Brescia et al., 2009, Zeni et al., 2012) è stato realizzato utilizzando tre guide d'onda poste in un incubatore per colture cellulari e alimentate in accordo con lo schema di Figura 4.4. Due guide d'onda erano usate per l'esposizione a RF mentre l'altra per le sham-esposizioni (SAR 0 W/kg). La simmetria della guida d'onda e della configurazione del campo propagato in essa, consente l'esposizione contemporanea di 4 colture cellulari: La coppia esterna è esposta ad un valore di SAR che è 1/4 di quello a cui è esposta la coppia interna. Le esposizioni sono pertanto condotte ai valori di SAR di 0.3 e 1.25 o 0.15 e 0.6 W/Kg come illustrato in figura 4.5 (a). L'assenza d'incremento termico all'interno dei campioni esposti è stata verificata in esperimenti preliminari, misurando la temperatura durante 24 ore di esposizione mediante un termometro a fibra ottica. Il set-up completo è mostrato nella figura 4.5 (b).

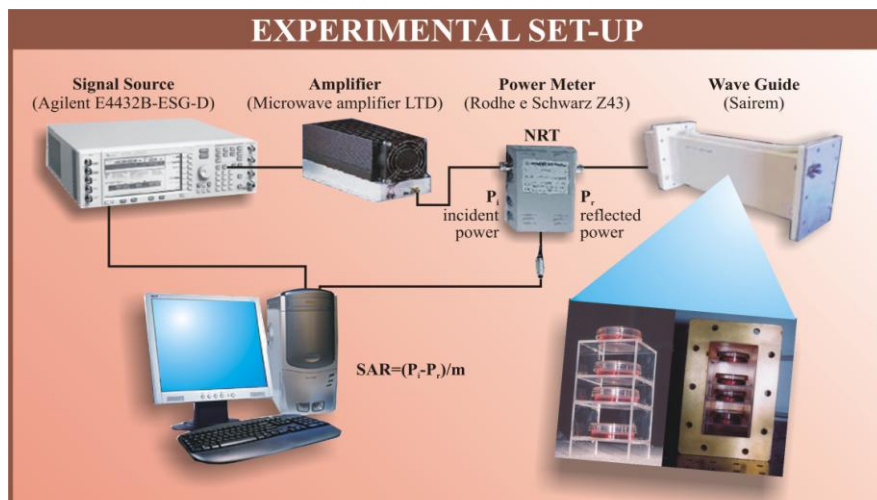
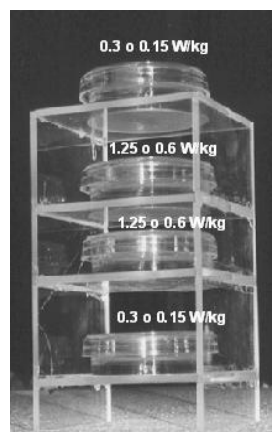


Figura 4.4 - Rappresentazione schematica del set-up di esposizione. Il segnale, emesso dal generatore (Agilent E44-32B ESG-D) viene amplificato (Microwave Amplifiers Ltd AM 38A-092S-40-43) e inviato alle guide d'onda mediante un divisore di potenza. I sensori di potenza bidirezionali (Rohde & Schwarz NRT-Z43) inseriti all' ingresso delle guide consentono di misurare le potenze (incidente, riflessa e trasmessa) durante l'esposizione. I valori di SAR venivano mantenuti costanti durante l'esposizione mediante un controllo a feedback tramite PC.



(a)



(b)

Figura 4.5 - Postazione di lavoro per eseguire le esposizioni a 1950MHz, segnale UMTS (a) e porta-campione che alloggia 4 capsule di Petri esposte ai diversi valori di SAR(b).

4.6 Test del micronucleo con blocco della citodieresi

Di seguito sono riportati i protocolli sperimentali per l'esecuzione del test del micronucleo con il blocco della citodieresi, e per allestire i vetrini da osservare al microscopio.

Colture di linfociti umani

Allo scopo di bloccare la citodieresi e ottenere le cellule binucleate (CB), dopo 44 ore dalla stimolazione con PHA alle colture cellulari è stata aggiunta Citocalasina-B (Cyt-B) alla concentrazione sub-tossica di 6 µg/ml. A 72h dalla stimolazione sono stati preparati i vetrini da osservare al microscopio.

Per colture di linfociti da sangue intero, 1 ml di coltura è stato centrifugato (3000g per 1 min.) e, dopo rimozione del sovrantante, i pellet sono stati trattati per 7 min. con 3 ml di tampone di lisi (Na-EDTA 10ml, NH₄Cl 155 mM e KCO₃ 10 mM) al fine di lisare gli eritrociti. Dopo tre lavaggi in terreno di coltura con FBS 2%, le cellule sono state trattate con soluzione ipotonica (una parte di RPMI, e quattro parti di acqua distillata) per 15 min e infine sono state deposte su vetrini da microscopio mediante centrifugazione con Cytospin (Shandon; 1200 r.p.m. per 7 minuti). I vetrini sono stati asciugati a temperatura ambiente e poi fissati mediante immersione per 10 minuti in una soluzione di metanolo all'80% in acqua distillata e successivamente colorati con una soluzione di Giemsa al 10% in tampone fosfato (pH = 7.0). Per ogni coltura sono stati allestiti un minimo di tre vetrini.

Nel caso delle colture di linfociti isolati è stata eseguita la stessa procedura, eccetto la lisi degli eritrociti.

Colture di V79

Il protocollo sperimentale adottato è stato modificato tenendo in conto il tempo di duplicazione delle V79 (14-16 ore). Dopo 28 ore dalla semina è stata aggiunta Cyt-B alla concentrazione di 3 µg/ml (Kirsh-Volders et al., 2003) per bloccare la citodieresi. Dopo 48 di crescita le cellule sono state staccate dal fondo delle Petri mediante trattamento con tripsina e centrifugate per 5 minuti a 390g. Dopo due lavaggi in terreno di coltura con FBS 2%, le cellule sono state deposte su vetrini da microscopio mediante centrifugazione con Cytospin. I vetrini sono stati fissati e colorati come descritto in precedenza. Per ogni coltura sono stati allestiti un minimo di tre vetrini.

Lo screening dei MN è stato effettuato in 2000 cellule binucleate (CB) con un microscopio ottico. Per la selezione delle CB e l'identificazione dei MN sono stati seguiti i criteri riportati nel capitolo 3.

4.7 Indice di proliferazione

Dagli stessi vetrini allestiti per la valutazione dei MN è stato possibile avere informazioni sulla cinetica della proliferazione cellulare calcolando, su di un totale di 1000 cellule, l'indice di proliferazione (IP) con il blocco della citodieresi, come suggerito da Surralles et al. (1995).

$$IP = [M1 + 2(M2) + 3(M3 + M4)] / N$$

ove M1-M4 rappresentano il numero di cellule mono (M1), di bi (M2) e plurinucleate (M3 e M4).

4.8 Test di esclusione del Trypan Blue

Per distinguere le cellule vitali da quelle morenti è stata eseguita la colorazione con Trypan blue, che è in grado di penetrare selettivamente all'interno delle cellule la cui membrana plasmatica non è più integra, colorandole di blu. Dopo diluizione della sospensione cellulare in Trypan blue (0.4 %) le cellule vengono contate alla camera di Burker. Il numero di cellule vitali per ml è stato ottenuto moltiplicando la media delle cellule vitali contate per il fattore della camera (10^4) e il fattore di diluizione. La percentuale di vitalità è stata calcolata come numero di cellule vive / cellule totali (vive+morte) X100.

4.9 Test dell'Annessina V-FITC/PI

Questo test citofluorimetrico misura l'esternalizzazione dei residui di fosfatidilserina come segnale di apoptosi. In cellule apoptotiche il complesso annessina-FITC si lega ai residui di fosfatidilserina emettendo fluorescenza nel verde; lo ioduro di propidio (PI) penetra nelle cellule morte. E' possibile quindi quantificare le cellule vive, le apoptotiche e le necrotiche.

Il test è stato eseguito utilizzando un kit commerciale (Bender Med System GmbH) e 3×10^5 cellule dopo lavaggio in PBS, sono state risospese in 250 μ l di binding buffer e 10 μ l di Annessina V coniugata con FITC. Dopo incubazione al buio per 10 minuti a temperatura ambiente e successivo lavaggio in PBS, il pellet è stato risospeso in 300 μ l di binding buffer e PI (20 μ g/ml). Per ogni campione sono stati acquisiti 15000 eventi (BDFacsCalibur), analizzati mediante il software FlowJo.

4.10 Test d'incorporazione dello ioduro di propidio (PI)

Questa tecnica citofluorimetrica consente di distinguere le cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare sulla base del contenuto di DNA, utilizzando la marcatura con PI, un fluorocromo (eccitazione a 488 nm ed emissione a 617 nm) che si lega stechiometricamente al DNA. Le cellule che hanno la membrana integra non incorporano PI, quindi è necessario permeabilizzarle.

Il test viene eseguito risospendendo 5×10^5 cellule in una soluzione costituita da RPMI e soluzione permeabilizzante (33 mM Sodio citrato, pH 8 + 0,1% Triton X-

100) contenente 50 µg/ml PI, in un rapporto 1:2. Dopo 30 minuti di incubazione a 4°C, per ciascun campione vengono acquisiti 25000 eventi (BDFacsCalibur) e analizzati mediante il software FlowJo.

4.11 Procedure sperimentali

Di seguito sono riportate le procedure sperimentali utilizzate in relazione alla finalità dell'esperimento.

4.11.1 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (900 MHz) in colture di linfociti umani: ruolo della fase del ciclo cellulare

Sono state allestite colture di linfociti umani da campioni di sangue periferico di 9 donatori sani (D1-D9). Sono state condotte esposizioni di 20h ad un SAR di 1.25 W/kg in differenti fasi del ciclo cellulare date come dose adattante (AD).

Com'è noto i linfociti umani da sangue periferico sono una popolazione cellulare naturalmente semi-sincronizzata, con più del 95% di cellule in fase G0 (Bender et al., 1998). In seguito alla stimolazione con PHA le cellule entrano in fase S dopo almeno 10 h di coltura (Wojcik et al., 1996) e la prima onda mitotica si verifica dopo circa 48 h (Bender et al., 1998). Sulla base di tali considerazioni può essere assunto che colture esposte prima della stimolazione, sono in fase G0, nelle colture esposte da 4 a 24h dopo PHA, la maggior parte dei linfociti si trova in fase G1, mentre si trovano in fase S durante le esposizioni da 24 a 44h dopo PHA. Tutte le colture venivano trattate con MMC (100 ng/ml) come dose challenge (CD) a 48h dopo la stimolazione con PHA, e venivano raccolte a 72 h. La valutazione di RA è stata eseguita applicando il test del MN con il blocco della citodieresi. Il protocollo sperimentale è riportato in figura 4.1.

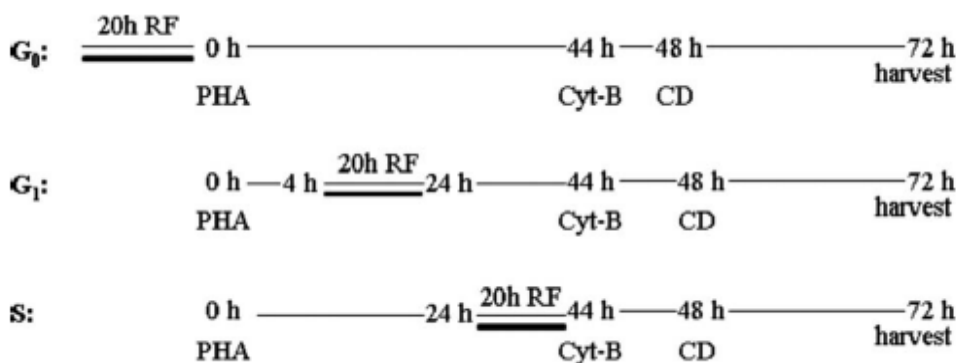


Figura 4.1 – Protocollo sperimentale applicato in colture di linfociti umani per valutare il ruolo della fase del ciclo cellulare nell'induzione di RA da RF (900 MHz).

Per tutti i donatori è stato verificato l'adattamento da pre-esposizioni a MMC, allestendo 4 colture: controllo, MMC 1 ng/ml (AD), MMC 100 ng/ml (CD), MMC (AD+CD).

Per valutare l'adattamento da RF sono state allestite 4 colture per ogni fase del ciclo esaminata: sham (SAR 0 W/kg), RF, sham + MMC, RF + MMC.

In tabella 4.1 sono riportati i trattamenti eseguiti per ogni donatore e il corrispondente numero di colture allestite.

Donatore	Trattamento			n° colture allestite/donatore
	AD	CD	AD+CD	
D1, D2, D3	1ng/ml MMC		(1+100)ng/ml	16
	RF/Sham (G0)	100ng/ml MMC	RF/Sham + 100	
	RF/Sham (G1)			
	RF/Sham (S)			
D4, D5, D6, D7	1ng/ml MMC		(1+100)ng/ml	12
	RF/Sham (G1)	100ng/ml MMC	RF/Sham + 100	
	RF/Sham (S)			
D8, D9	1ng/ml MMC	100ng/ml MMC	(1+100)ng/ml	8
	RF/Sham (G0)		RF/Sham + 100	

Tabella 4.1 – Trattamenti eseguiti nelle colture di linfociti umani ottenute da 9 donatori (D1-D9).

4.11.2 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani

Sono state allestite colture di linfociti umani da campioni di sangue periferico di 9 donatori sani (D10-D18). Sono state condotte esposizioni a differenti valori di SAR (0.15, 0.3, 0.6, 1.25 W/kg) date come dose adattante (AD). Le esposizioni sono state eseguite durante la fase S del ciclo cellulare (da 24 h a 44 h dalla PHA); è stata usata la MMC (100 ng/ml) come dose challenge (CD), aggiunta a 48 h dalla stimolazione. La valutazione di RA è stata eseguita applicando il test del MN con il blocco della citodieresi.

In particolare, le colture dai donatori D10-D12 erano esposte alla coppia di SAR 0.3 e 1.25 W/kg; quelle dai donatori D13-D15 erano esposte alla coppia di SAR 0.6 e 0.15 W/kg, mentre quelle dai donatori D16-D18 erano esposte contemporaneamente ai 4 valori di SAR considerati. I trattamenti per la valutazione di RA nei differenti donatori sono presentati in tabella 4.2. Per tutti i donatori è stato verificato l'adattamento da pre-esposizioni a MMC, allestendo 4 colture come descritto nel paragrafo precedente.

Per valutare l'adattamento da RF sono state allestite 6 colture per ogni coppia di SAR esaminata: sham (SAR 0 W/kg), RF (1.25 o 0.6 W/kg), RF (0.3 o 0.15 W/kg), sham + MMC, RF (1.25 o 0.6 W/kg) + MMC, RF (0.3 o 0.15 W/kg) + MMC.

In tabella 4.2 sono riportati i trattamenti eseguiti per ogni donatore e il corrispondente numero di colture allestite.

Donatore	Trattamento			n° colture allestite/donatore
	AD	CD	AD+CD	
D10, D11, D12	1ng/ml MMC	100ng/ml MMC	(1+100)ng/ml	10
	RF/Sham 0,3 e 1,25 W/kg		RF/Sham + 100	
D13, D14, D15	1ng/ml MMC	100ng/ml MMC	(1+100)ng/ml	10
	RF/Sham 0,15 e 0,6 W/kg		RF/Sham + 100	
D16, D17, D18	1ng/ml MMC	100ng/ml MMC	(1+100)ng/ml	16
	RF/Sham 0,3 e 1,25 W/kg		RF/Sham + 100	
	RF/Sham 0,15 e 0,6 W/kg			

Tabella 4.2 – Trattamenti eseguiti nelle colture di linfociti umani ottenute da 9 donatori (D10-D18).

4.11.3 Risposta adattativa ai raggi X indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani

Sono state allestite colture di linfociti umani da campioni di sangue periferico da 3 donatori sani (D19-D21). Al fine di valutare il ruolo dell'agente challenge nell'induzione di RA da RF sono stati utilizzati i raggi X.

Le esposizioni, in fase S del ciclo cellulare sono state eseguite al SAR di 0.3 W/kg, e le dosi di 1 o 1.5 Gy sono state utilizzate come dosi challenge, somministrate a 48 h dalla PHA. La valutazione di RA è stata eseguita applicando il test del MN con il blocco della citodieresi.

Per ciascun donatore sono state allestite 12 colture per verificare a) se i donatori rispondevano all'adattamento da raggi X (controllo; 1 cGy; 1 Gy; 1.5 Gy; 1cGy + 1 Gy; 1cGy + 1.5 Gy) e b) la capacità delle esposizioni a RF ad indurre AR quando combinata con raggi (sham; RF; sham + 1 Gy; sham + 1.5 Gy; RF; RF + 1 Gy; RF + 1.5 Gy).

4.11.4 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz): il ruolo del tipo cellulare impiegato

Trattamenti di V79

Sono state allestite colture cellulari di linee stabilizzate di criceto (V79) per condurre tre esperimenti indipendenti al fine di valutare il ruolo del tipo cellulare nell'induzione di RA da RF. Le esposizioni sono state condotte al SAR di 0.3 e 1.25 W/kg, come dose adattante (da 8h a 28 h dalla semina), e sono state impiegate due dosi di MMC come agente challenge (333 ng/ml e 500 ng/ml) (da 32h a 48 h dalla semina). La valutazione di RA è stata eseguita applicando il test del MN con il blocco

della citodieresi. Una rappresentazione schematica del protocollo sperimentale è riportata in figura 4.2 sulla base del tempo di duplicazione di queste cellule (14-16 h, nelle nostre condizioni di crescita).

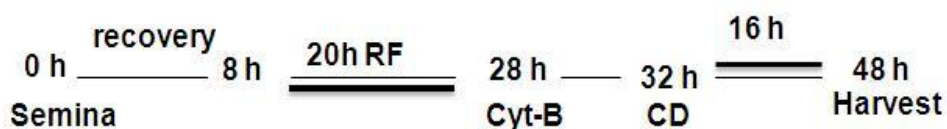


Figura 4.2 – Protocollo eseguito per la sperimentazione.

In particolare, per ciascun esperimento sono state allestite 12 colture: controllo, MMC (333 ng/ml), MMC (500 ng/ml), sham (SAR 0 W/kg), sham-esposta + MMC (333 ng/ml), sham-esposta + MMC (500 ng/ml), RF (0.3 W/kg), RF (1.25 W/kg), RF (0.3 W/kg) + MMC (333 ng/ml), RF (0.3 W/kg) + MMC (500 ng/ml), RF (1.25 W/kg) + MMC (333 ng/ml), RF (1.25 W/kg) + MMC (500 ng/ml)

Trattamenti di linfociti isolati da buffy coat

Per verificare, mediante il test del MN, che le condizioni che davano adattamento nei colture di linfociti da sangue intero erano anche idonee a evocare RA in linfociti isolati da buffy coat dello stesso donatore, sono state allestite colture di linfociti umani da sangue intero (WB) e isolati (IL) da 3 donatori sani (D22-D24). Per la sperimentazione sono state adottate le condizioni che nelle colture di WB davano adattamento (0.3 W/kg in fase S; MMC 100 ng/ml). Per ogni donatore sono state allestite in parallelo 8 colture di sangue intero (WB) e 8 colture di linfociti isolati da buffy coat (IL) per valutare l'adattamento da MMC (controllo, 1 ng/ml MMC, 100 ng/ml MMC; 1+100 MMC) e l'adattamento da RF (sham, sham + MMC, RF, RF + MMC).

4.11.5 Valutazione dei possibili meccanismi di azione alla base della RA indotta da RF

Vitalità, ciclo cellulare e apoptosi

Nel caso delle V79 sono stati condotti 3 esperimenti indipendenti per valutare la vitalità, mediante il test del tripan blue e il ciclo cellulare, applicando il metodo citofluorimetrico dell'incorporazione di ioduro di propidio. I trattamenti combinati sono stati eseguiti al SAR di 1.25 W/kg utilizzando 500 ng/ml di MMC. Per ogni esperimento sono state allestite 6 colture (controllo, MMC, sham (SAR 0 W/kg), sham + MMC, RF, RF + MMC)

Nel caso dei linfociti isolati sono stati impiegati 3 donatori (D25-D27) per saggiare vitalità, ciclo cellulare e apoptosi (test dell'annessina V-FITC/PI) ma ad un SAR di 0.3 W/kg e 100 ng/ml di MMC. In questo caso sono state allestite 4 colture per ogni donatore (sham, sham + MMC, RF, RF + MMC).

Inibizione del riparo del DNA con 3AB

Il coinvolgimento degli enzimi di riparo del DNA nella RA da RF è stato valutato sia in colture di V79 sia in colture di linfociti umani isolati da buffy coat, utilizzando la 3AB come inibitore della Poli-AD-polimerasi (PARP). Per ogni tipo cellulare sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti nelle condizioni che inducevano adattamento (V79: 20 h di esposizione a SAR di 1.25 W/kg e 500 ng/ml MMC; linfociti: 20 h di esposizione a SAR di 0.3 W/kg e 100 ng/ml MMC). La 3AB, alla concentrazione di 2 mM, è stata aggiunta insieme alla MMC (dopo 32 e 48 ore per le V79 e i linfociti, rispettivamente). Per ogni esperimento sono state allestite 12 colture: controllo +/- 3AB; MMC +/- 3AB; sham (SAR 0 W/kg) +/- 3AB; sham + MMC +/- 3AB; RF +/- 3AB; RF + MMC +/- 3AB.

4.12 Analisi statistica

I risultati relativi al test del MN e all'indice di proliferazione nei diversi trattamenti verso i corrispondenti controlli sono stati analizzati mediante il test del *t* di Student per dati appaiati.

Nel caso dei trattamenti combinati, per ogni donatore e, nel caso delle V79, per ogni esperimento, è stato calcolato il numero di MN attesi come la somma dei MN osservati nei due trattamenti individuali sottratta dei MN osservati nel controllo. E' stato poi applicato il test Z ad una coda per valutare la significatività statistica dei MN osservati rispetto a quelli attesi.

I risultati relativi alla vitalità, apoptosi e ciclo cellulare sono analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza per misure ripetute (ANOVA) seguita dall'analisi post-hoc col test di Bonferroni.

In ogni caso la significatività statistica è stata prestabilita per valori di $p < 0.05$.

CAPITOLO 5

Risultati

5.1 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (900 MHz) in colture di linfociti umani: ruolo della fase del ciclo cellulare

In un lavoro precedente si è riscontrato che colture di linfociti umani da sangue intero pre-esposte a RF (900 MHz, segnale GSM, SAR di 1.25 W/kg) in fase S del ciclo cellulare mostravano risposta adattativa a trattamenti con MMC (Sannino et al., 2009).

In questa sperimentazione si è valutato il ruolo della fase del ciclo in cui viene eseguita la pre-esposizione nell'induzione di RA. Colture da nove donatori sani (D1-D9) sono state esposte a RF. In particolare, colture da tre donatori (D1, D2, D3) sono state pre-esposte a RF per 20 ore in fase G0 (prima della stimolazione con PHA), G1 (da 4 a 24 ore dopo la PHA) e S (da 24 a 44 ore dopo la PHA). Colture da quattro donatori (D4, D5, D6, D7) sono state pre-esposte in fase G1 ed S, mentre colture da due donatori (D8 e D9) sono state pre-esposte in fase G0. Per tutti i donatori sono state anche allestite colture per valutare l'induzione di risposta adattativa da MMC usando come dose adattante MMC (1 ng/ml). I risultati ottenuti in termini di frequenza di MN sono riportati in tabella 5.1, dove per i trattamenti combinati (MMC/MMC, Sham/MMC, RF/MMC) viene anche riportata la percentuale di decremento di MN e il valore di p (test Z).

I risultati relativi all'indice di proliferazione sono riportati in tabella 5.2. Per tutti i donatori esaminati non si sono riscontrate differenze sia in termini di MN sia di proliferazione tra i campioni di controllo e quelli sham esposti, indicando che il microambiente nel sistema di esposizione non altera i parametri in esame.

Anche il confronto tra i campioni esposti e i rispettivi sham esposti non ha evidenziato effetti indotti dalla sola RF sia in termini di danno al DNA che di proliferazione. I trattamenti con MMC alla dose di 1 ng/ml inducevano un lieve incremento della frequenza di MN senza però alterare la proliferazione cellulare. Di contro, come atteso, nei campioni trattati con la dose maggiore di MMC (100 ng/ml) si è riscontrato un incremento di MN e un decremento dell'indice di proliferazione ($p < 0.01$; test t per dati appaiati).

I risultati dei trattamenti combinati, riportati in tabella 5.1 e schematizzati in figura 5.1, indicano che il pre-trattamento con 1 ng/ml di MMC seguito dalla dose challenge induceva un decremento di MN statisticamente significativo ($p < 0.05$), indicando che tutti i donatori si adattavano alla MMC ("responder"), senza influire sull'indice di proliferazione (tabella 5.2).

La pre-esposizione a RF in fase G0 (figura 5.2.a) e G1 (figura 5.2.b) non induceva variazioni significative del numero di MN osservati rispetto agli attesi, mentre la RF in fase S induceva un decremento di MN che variava dal 43 al 54% in base al donatore esaminato ($p < 0.05$), come riportato in figura 5.2.c. Inoltre, per tutte le condizioni di pre-esposizione non si evidenziava una ulteriore riduzione della proliferazione rispetto alle colture trattate con la sola MMC alla dose challenge (100 ng/ml), tabella 5.2. Il pre-trattamento con sham-esposizione non induceva variazioni significative dei parametri esaminati.

Nell'insieme, i risultati ottenuti indicano che la pre-esposizione di colture di linfociti umani alla frequenza di 900 MHz è in grado di indurre RA solo quando viene effettuata durante la fase S del ciclo cellulare.

Trattamento	Donatore								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Controllo	6	10	15	16	18	15	27	7	11
1 ng/ml MMC	14	20	18	33	27	28	33	12	10
100 ng/ml MMC	53	36	45	60	57	58	78	136	38
1+100 ng/ml MMC	34	21	26	42	42	48	55	100	19
% riduzione	44,00	54,00	46,00	45,00	36,00	32,00	35,00	29,00	49,00
p (test-Z)	0,004	0,003	0,015	0,002	0,022	0,028	0,017	0,004	0,020
Sh(G0)	7	13	12					9	11
Sh(G0)+100ng/ml MMC	44	35	53					136	48
% riduzione	19,00	10,00	-26,00					1,00	-26,00
p (test-Z)	0,167	0,339	0,840					0,452	0,834
RF(G0)	7	11	16					11	10
RF(G0)+100ng/ml MMC	40	34	48					120	49
% riduzione	26,00	8,00	-4,00					14,00	-32,00
p (test-Z)	0,085	0,376	0,572					0,106	0,878
Sh(G1)	6	12	14	21	18	20	32		
Sh(G1)+100ng/ml MMC	43	40	50	66	58	60	78		
% riduzione	19,00	-5,00	-14,00	-2,00	2,00	5,00	6,00		
p (test-Z)	0,165	0,581	0,935	0,530	0,470	0,413	0,364		
RF(G1)	5	14	12	19	21	22	27		
RF(G1)+100ng/ml MMC	40	41	55	57	46	57	68		
% riduzione	23,00	-3,00	-31,00	10,00	23,00	12,00	13,00		
p (test-Z)	0,117	0,54	0,878	0,31	0,117	0,256	0,236		
Sh(S)	6	12	11	26	21	19	30		
Sh(S)+100ng/ml MMC	54	36	48	58	49	62	80		
% riduzione	-2,00	5,00	-17,00	17,00	18,00	0,00	1,00		
p (test-Z)	0,537	0,418	0,742	0,168	0,178	0,5	0,472		
RF(S)	8	9	14	24	24	27	27		
RF(S)+100ng/ml MMC	29	16	25	36	31	45	45		
% riduzione	47,00	54,00	43,00	47,00	51,00	36,00	42,00		
p (test-Z)	0,004	0,012	0,027	0,003	0,002	0,018	0,006		

Tabella 5.1 - Micronuclei osservati in colture di linfociti umani di 9 donatori esposti a 1ng/ml MMC, RF o Sham in fase G0- G1- e S del ciclo cellulare +/- 100 ng/ml MMC. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate.

Trattamento	Donatore								
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9
Controllo	2,20	2,10	1,90	1,60	1,60	1,80	2,10	1,90	1,90
1 ng/ml MMC	2,10	2,10	1,80	1,80	1,70	1,70	2,00	1,70	1,80
100 ng/ml MMC*	1,80	1,90	1,70	1,40	1,50	1,70	1,80	1,40	1,60
1+100 ng/ml MMC*	1,80	1,80	1,60	1,40	1,50	1,90	1,70	1,40	1,60
Sh(G0)	2,20	2,00	2,00					1,70	1,90
Sh(G0)+100ng/ml MMC*	1,80	1,90	1,80					1,40	1,60
RF(G0)	2,10	2,00	2,00					1,80	1,90
RF(G0)+100ng/ml MMC*	1,80	1,90	1,80					1,40	1,60
Sh(G1)	2,10	2,20	1,70	1,60	1,60	1,90	2,00		
Sh(G1)+100ng/ml MMC*	1,70	1,80	1,70	1,50	1,50	1,70	1,80		
RF(G1)	2,20	2,20	1,80	1,70	1,80	1,90	2,00		
RF(G1)+100ng/ml MMC*	1,80	1,80	1,70	1,50	1,50	1,70	1,60		
Sh(S)	2,00	2,20	2,10	1,60	1,70	2,10	2,00		
Sh(S)+100ng/ml MMC*	1,80	1,90	1,90	1,50	1,50	1,70	1,80		
RF(S)	2,00	2,30	1,80	1,70	1,70	2,00	2,10		
RF(S)+100ng/ml MMC*	1,80	2,00	1,60	1,50	1,60	1,80	1,60		

Tabella 5.2 – Indice di proliferazione in colture di linfociti umani da sangue intero di 9 donatori esposti a 1ng/ml MMC, RF o Sham in fase G0- G1- e S del ciclo cellulare +/- 100 ng/ml MMC. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 1000 cellule. *p<0.01 (t di Student per dati appaiati).

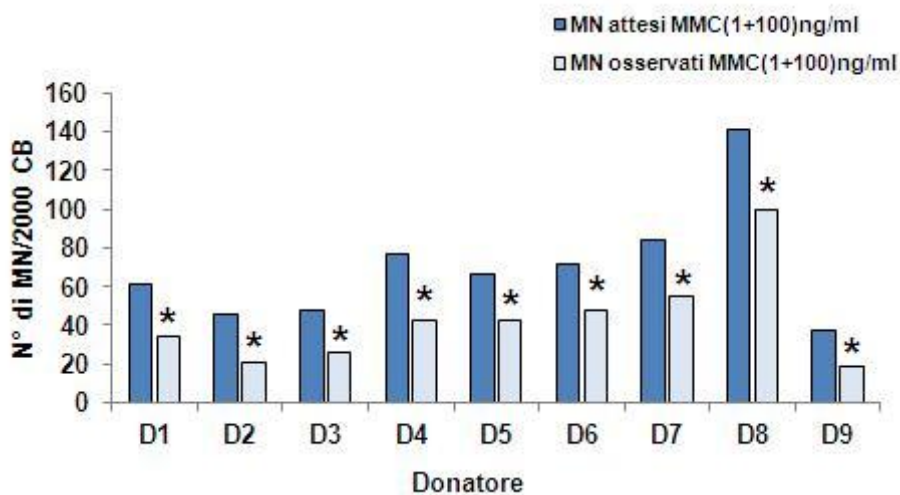


Figura 5.1 - MN attesi e osservati in colture trattate con MMC (1+100 ng/ml) di 9 donatori. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: * p<0.05 (test Z).

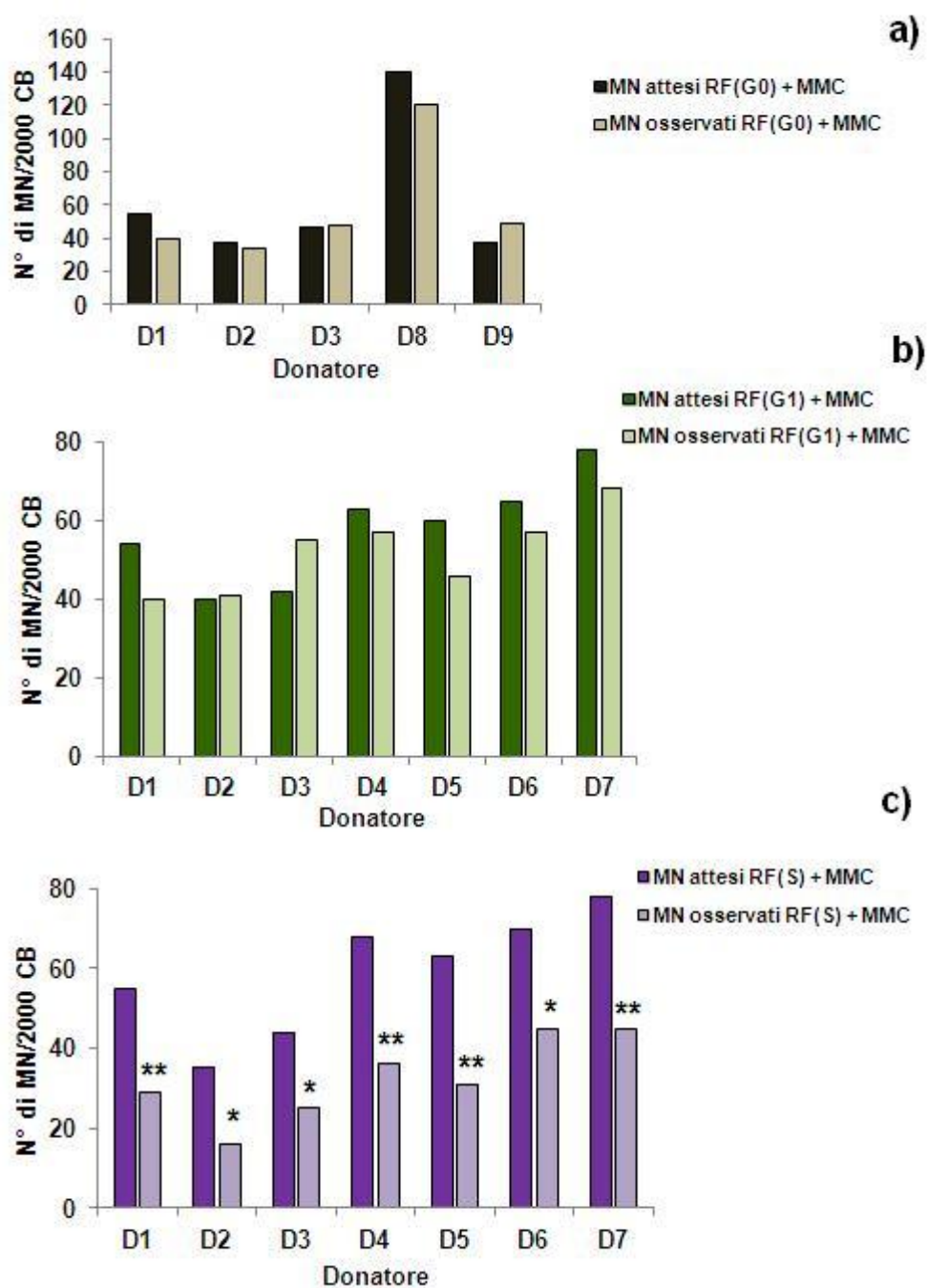


Figura 5.2 - MN attesi e MN osservati in colture pre-esposte a RF in fase G₀ (a), G₁ (b) o S (c) del ciclo cellulare e trattate con MMC (100ng/ml). Per ogni soggetto/trattamento sono stati analizzati 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: * p<0.05; **p<0.01 (test Z).

5.2 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani

Allo scopo di verificare se la RA indotta da esposizioni a 900 MHz, segnale GSM, fosse evocata anche da altri segnali a RF, sono state condotte esposizioni di 20h a 1950 MHz, segnale UMTS, in colture di sangue intero da nove donatori (D10-D18) ed è stato inoltre verificato il ruolo del SAR (0.15, 0.3, 0.6, 1.25 W/kg).

In tabella 5.3 è riportato il numero di MN per tutte le condizioni esaminate con le percentuali di decremento e il valore di p (test Z) nel caso dei trattamenti combinati. L'indice di proliferazione è riportato in tabella 5.4.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra le colture sham-esposte e i rispettivi controlli sia in termini di MN che di proliferazione. Risultati simili sono stati ottenuti confrontando le colture esposte a RF e le rispettive sham-esposte. Quindi si può affermare che sia il microambiente nella guida d'onda sia l'esposizione a 1950 MHz non influenzano i parametri esaminati.

I trattamenti con MMC hanno confermato i risultati ottenuti nella sperimentazione precedente: la dose di 1 ng/ml non induce incremento di MN e non influenza l'indice di proliferazione mentre alla dose challenge (100 ng/ml) si riscontra un incremento di MN e una diminuzione della proliferazione rispetto alle colture di controllo ($p < 0.01$). Inoltre, nelle colture trattate prima con 1 ng/ml e poi con 100 ng/ml di MMC è stata sempre riscontrata una riduzione di MN rispetto alle colture trattate solo con la dose maggiore. Tale riduzione variava dal 29 al 54% in base al donatore esaminato e in due soggetti non è risultata statisticamente significativa (D11: 27%; D13: 30%), come riportato in figura 5.3.

Per quanto riguarda le pre-esposizioni a RF, tutti i donatori non mostravano variazioni nella frequenza di MN quando veniva impiegato un SAR di 1.25 W/kg (figura 5.4.a) o di 0.15 W/kg (figura 5.4.d). Di contro, tutti i donatori pre-esposti con 0.3 W/kg mostravano un decremento di MN statisticamente significativo, con una percentuale di riduzione che variava dal 32 al 65% in base al donatore esaminato (figura 5.4.b). Pre-esposizioni con 0.6 W/kg inducevano un decremento di MN solo in tre dei sei donatori esaminati (D14, D15, D16), come riportato in figura 5.4.c.

In tutti i soggetti esaminati non sono state riscontrate variazioni significative nelle colture pre-trattate con sham-esposizioni.

Questi risultati indicano che esposizioni alla frequenza di 1959 MHz con modulazione UMTS sono in grado di indurre RA in linfociti umani dello stesso ordine di grandezza di quella indotta da esposizioni a 900 MHz con modulazione GSM. Inoltre si evidenzia che l'effetto è dipendente dal valore di SAR impiegato.

Trattamento	Donatore								
	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18
Controllo	22	15	12	15	11	9	16	6	10
1 ng/ml MMC	29	12	9	18	11	8	13	14	20
100 ng/ml MMC	70	63	40	43	45	73	65	53	36
1+100 ng/ml MMC	47	44	20	32	27	47	42	34	21
% riduzione	39,00	27,00	46,00	30,00	40,00	35,00	32,00	44,00	54,00
p (test-Z)	0,010	0,081	0,029	0,087	0,031	0,015	0,040	0,004	0,004
RF o Sham, SAR 0,3W/kg									
Sh	22	15	12				10	7	9
Sh + 100ng/ml MMC	67	70	42				52	47	30
% riduzione	4,00	-11,00	-5,00				12,00	13,00	14,00
p (test-Z)	0,410	0,711	0,578				0,270	0,253	0,292
RF	20	12	15				13	5	10
RF+100ng/ml MMC	25	41	18				22	25	15
% riduzione	63,00	32,00	58,00				65,00	52,00	58,00
p (test-Z)	0,001	0,047	0,003				0,001	0,002	0,006
RF o Sham, SAR 1,25W/kg									
Sh	22	15	12				10	7	9
Sh + 100ng/ml MMC	67	70	42				52	47	30
% riduzione	4,00	-11,00	-5,00				12,00	13,00	14,00
p (test-Z)	0,410	0,711	0,578				0,270	0,253	0,292
RF	27	15	20				9	7	12
RF+100ng/ml MMC	68	64	50				42	50	28
% riduzione	9,00	-2,00	-4,00				28,00	7,00	26,00
p (test-Z)	0,302	0,532	0,573				0,079	0,354	0,139
RF o Sham, SAR 0,15W/kg									
Sh				13	10	9	10	7	11
Sh+ 100ng/ml MMC				43	40	61	46	53	41
% riduzione				-5,00	9,00	16,00	22,00	2,00	-11,00
p (test-Z)				0,575	0,348	0,162	0,130	0,463	0,650
RF				14	8	11	10	8	12
RF+100ng/ml MMC				57	29	58	52	41	38
% riduzione				-36,00	31,00	23,00	12,00	26,00	0,00
p (test-Z)				0,909	0,087	0,080	0,270	0,087	0,500
RF o Sham, SAR 0,6W/kg									
Sh				13	10	9	10	7	11
Sh+ 100ng/ml MMC				43	40	61	46	53	41
% riduzione				-5,00	9,00	16,00	22,00	2,00	-11,00
p (test-Z)				0,575	0,348	0,162	0,130	0,463	0,650
RF				14	10	8	9	6	10
RF+100ng/ml MMC				35	28	50	38	47	36
% riduzione				17,00	36,00	31,00	35,00	11,00	0,00
p (test-Z)				0,247	0,048	0,030	0,037	0,280	0,500

Tabella 5.3 - Micronuclei osservati in colture di linfociti umani di 9 donatori trattate con 1ng/ml MMC, RF a diversi SAR (0.15; 0.3; 0.6; 1.25 W/kg) o sham esposte+/- 100 ng/ml MMC. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate.

Trattamento	Donatore								
	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18
Controllo	1,90	2,00	1,90	2,00	2,10	2,00	1,90	2,10	2,10
1 ng/ml MMC	2,00	2,10	2,00	1,80	2,00	2,10	2,10	2,10	2,10
100 ng/ml MMC**	1,70	1,80	1,70	1,70	1,90	2,00	1,60	1,80	1,90
1+100 ng/ml MMC**	1,70	1,70	1,60	1,60	1,70	1,90	1,60	1,80	1,80
RF o Sham, SAR 0,3W/kg									
Sh	1,80	2,00	1,90				1,90	2,20	2,10
Sh+100ng/ml MMC**	1,60	1,80	1,60				1,80	1,80	1,90
RF	1,90	2,00	1,80				1,90	2,30	2,20
RF+100ng/ml MMC**	1,80	1,80	1,60				1,80	1,80	1,90
RF o Sham, SAR 1,25W/kg									
Sh	1,80	2,00	1,90				1,90	2,20	2,10
Sh+100ng/ml MMC**	1,60	1,80	1,60				1,80	1,80	1,90
RF	1,90	2,10	1,70				2,00	2,30	2,20
RF+100ng/ml MMC**	1,70	1,80	1,50				1,70	1,80	1,90
RF o Sham, SAR 0,15W/kg									
Sh				1,90	2,10	1,90	1,90	2,10	2,20
Sh+100ng/ml MMC**				1,70	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
RF				2,00	2,10	2,10	1,80	2,30	2,30
RF+100ng/ml MMC**				1,60	1,90	1,90	1,70	1,80	1,80
RF o Sham, SAR 0,6W/kg									
Sh				1,90	2,10	1,90	1,90	2,10	2,20
Sh+100ng/ml MMC**				1,70	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80
RF				1,90	2,20	2,10	1,90	2,20	2,20
RF+100ng/ml MMC**				1,60	1,90	1,80	1,60	1,80	1,90

Tabella 5.4 - Indice di proliferazione in colture di linfociti da sangue intero di 9 donatori esposti a 1ng/ml MMC, RF o Sham ai diversi SAR (0.15; 0.3; 0.6; 1.25 W/kg) +/- 100 ng/ml MMC. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 1000 cellule.

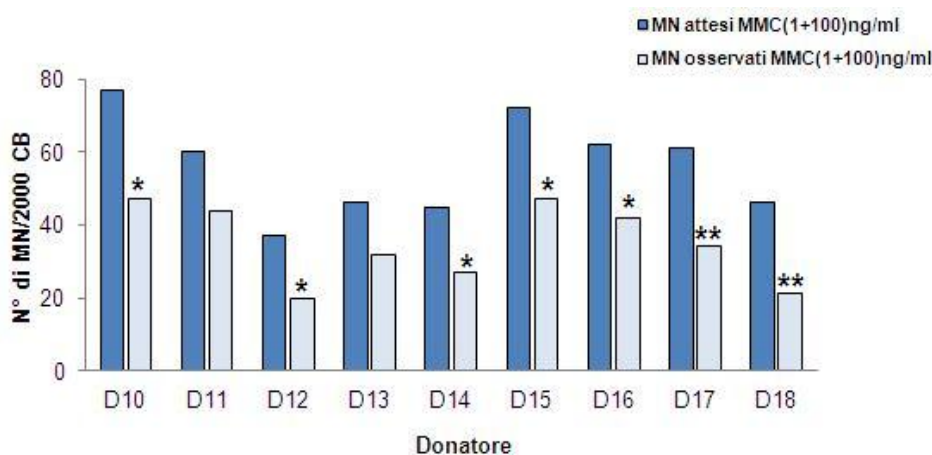


Figura 5.3 - MN attesi e osservati in colture trattate a MMC (1+100 ng/ml) di 9 donatori (D10-D18). Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: *p<0,05; **p<0,01 (test Z).

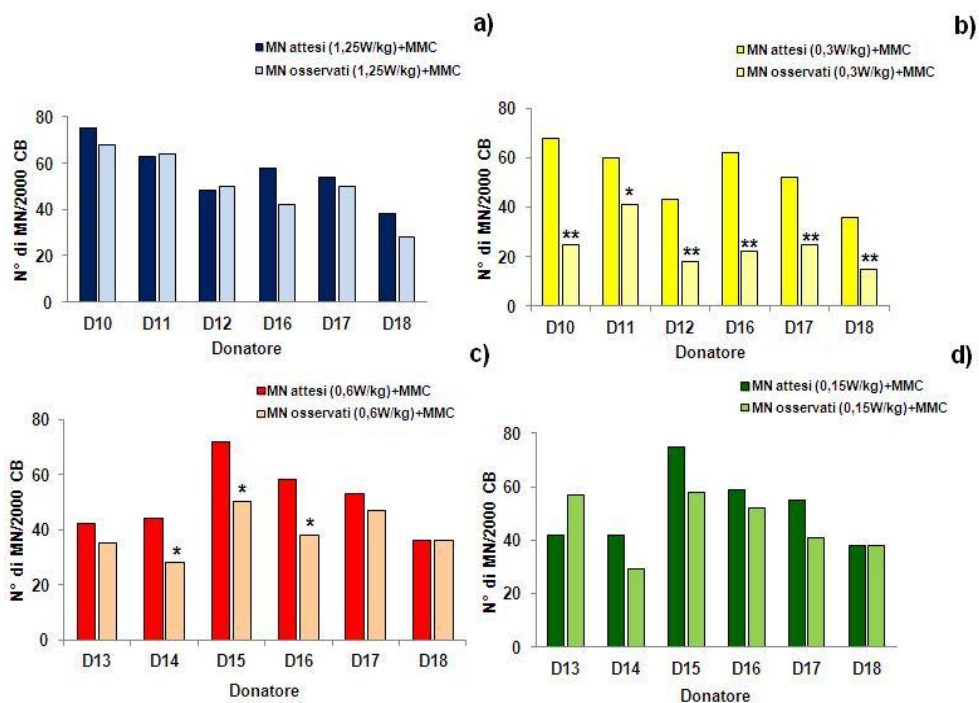


Figura 5.4 - MN attesi e MN osservati in colture di linfociti umani pre-esposte/sham esposte alla frequenza di 1950 MHz e SAR di 1.25 W/kg (a), 0.3 W/kg (b), 0.6 W/kg (c), 0.15 W/kg (d) e trattate con MMC (100 ng/ml). Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test Z).

5.3 Risposta adattativa ai raggi X indotta da RF (1950 MHz) in colture di linfociti umani

Al fine di valutare se esposizioni a RF sono in grado di ridurre anche il danno diretto al DNA, è stata condotta una sperimentazione su colture di linfociti da sangue intero di tre donatori (D19, D20, D21). Le esposizioni di 20 ore (in fase S del ciclo cellulare) sono state eseguite nelle condizioni che nella sperimentazione precedente (5.2) hanno evidenziato la migliore risposta in termini di adattamento (1950 MHz, SAR di 0.3 W/kg). Come dose challenge sono stati impiegati i raggi X (1 Gy e 1.5 Gy). Inoltre, 1 cGy è stato impiegato come dose adattante per verificare se i donatori rispondevano all'adattamento da raggi X. I risultati per tutte le condizioni sperimentali esaminate sono riportati nelle tabelle 5.5 e 5.6 in termini di MN e proliferazione, rispettivamente.

I risultati dei singoli trattamenti sono stati analizzati con il t di Student per dati appaiati: e non sono state riscontrate alterazioni dei parametri esaminati in tutti i campioni sham-esposti, esposti a RF o trattati con 1 cGy di raggi X rispetto ai controlli. Come atteso, entrambe le dosi di 1 Gy e 1.5 Gy inducevano un incremento di MN e una riduzione della proliferazione rispetto alle colture di controllo ($p < 0.05$).

Per quanto riguarda i trattamenti combinati, per tutti i donatori esaminati le colture pre-esposte a 1 cGy mostrano un decremento statisticamente significativo del danno indotto al DNA da trattamenti con 1.5 Gy e una riduzione di minore entità (non significativa nel caso del donatore D19) del danno indotto da 1 Gy (figura 5.5.a), mentre non sono state riscontrate alterazioni nella proliferazione rispetto ai trattamenti con le sole dosi challenge.

Le pre-esposizioni a RF hanno fornito risultati del tutto analoghi, indicando che la RF è efficace nell'indurre adattamento di entità equivalente a quello indotto dalla bassa dose di raggi X (1 cGy), come riportato in figura 5.5.b.

Questa sperimentazione ha evidenziato che pre-esposizioni a RF sono in grado di ridurre il danno al DNA indipendentemente dalla natura e dal meccanismo di azione del mutageno impiegato. Infatti, mentre la mitomicina è un agente alchilante che induce crosslink al DNA, i raggi X sono un agente clastogeno che induce rotture al singolo e al doppio filamento di DNA.

Trattamento	Donatore		
	D19	D20	D21
Controllo	13	13	4
1 cGy-X	12	18	7
1 Gy-X	96	197	118
1,5 Gy-X	141	210	150
1 cGy-X+1 Gy-X	87	107	96
% riduzione	8,42	47,03	20,66
p (test - Z)	0,336	0,000	0,037
1 cGy-X+1,5 Gy-X	90	141	48
% riduzione	35,71	34,42	68,63
p (test - Z)	0,000	0,000	0,000
Sh	10	15	5
Sh+1 Gy-X	82	184	110
% riduzione	11,83	7,54	7,56
p (test - Z)	0,236	0,204	0,252
Sh+1,5 Gy-X	127	230	130
% riduzione	7,97	-8,49	13,91
p (test - Z)	0,273	0,810	0,090
RF	10	18	4
RF+1 Gy-X	92	142	81
% riduzione	1,08	29,7	31,36
p (test - Z)	0,500	0,001	0,005
RF+1,5 Gy-X	95	149	60
% riduzione	31,16	30,70	60,00
p (test - Z)	0,003	0,000	0,000

Tabella 5.5 - Micronuclei osservati in colture di linfociti di 3 donatori esposti a 1 cGy, RF/Sham, +/- 1 o 1.5 Gy. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate.

Trattamento	Donatore		
	D19	D20	D21
Controllo	2,12	2,10	1,82
1 cGy-X	1,98	2,08	1,70
1 Gy-X*	1,73	1,69	1,38
1 cGy-X + 1 Gy-X*	1,56	1,69	1,52
1,5 Gy-X*	1,63	1,80	1,10
1 cGy-X + 1,5 Gy-X*	1,65	1,80	1,38
Sh	2,07	1,95	1,84
Sh + 1 Gy-X*	1,72	1,66	1,50
Sh + 1,5 Gy-X*	1,61	1,71	1,47
RF	1,96	1,96	1,78
RF+1 Gy-X*	1,74	1,70	1,46
RF+1,5 Gy-X*	1,60	1,67	1,34

Tabella 5.6 – Indice di proliferazione in colture di linfociti da sangue intero di 4 donatori esposti a 1cGy, RF o Sham +/- 1 o 1,5 Gy. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 1000 cellule. *p<0.05 (t di Student per dati appaiati).

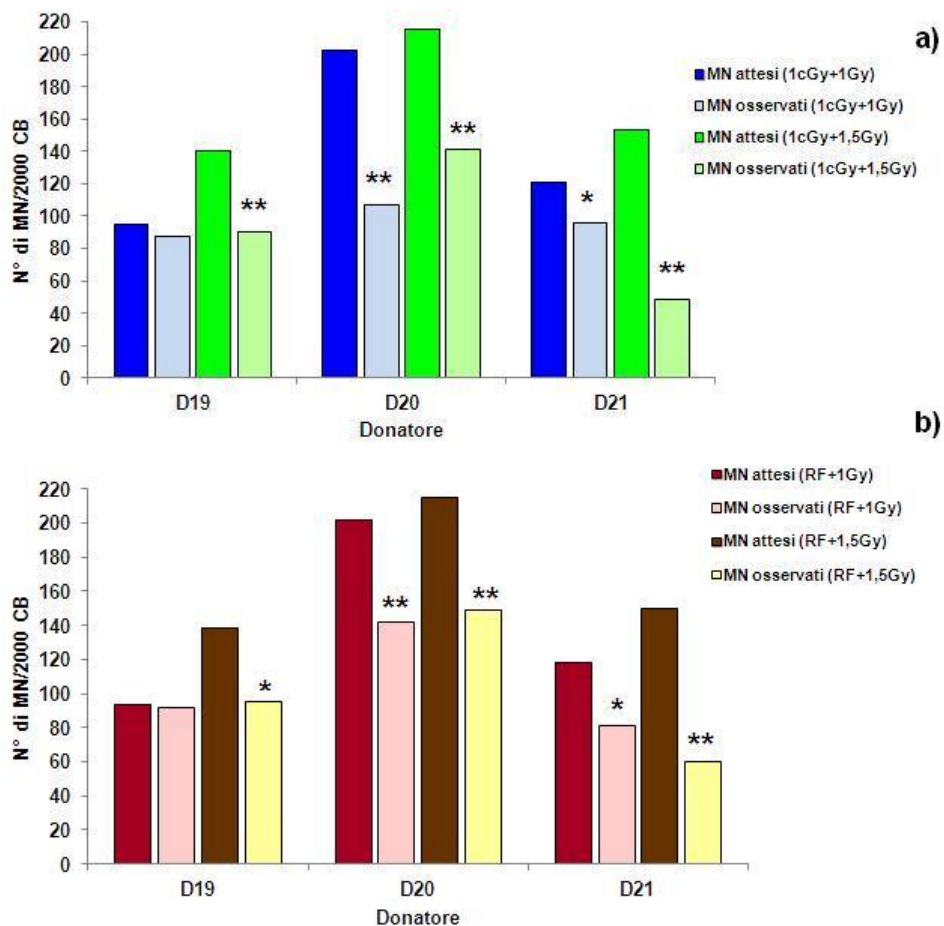


Figura 5.5 - MN attesi e MN osservati in colture di linfociti umani pre-esposte a 1cGy di raggi X (a) o a RF, SAR di 0.3 W/kg (b) e trattate con 1 Gy o 1.5 Gy. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: *p<0,05; **p<0,01 (test Z).

5.4 Risposta adattativa alla MMC indotta da RF (1950 MHz): il ruolo del tipo cellulare impiegato

Al fine di valutare se il fenomeno della RA indotta da RF fosse riscontrabile specificamente nei linfociti umani o anche in altri tipi cellulari, è stata svolta una sperimentazione impiegando colture cellulari di V79, una linea stabilizzata di fibroblasti polmonari di criceto, e sono state saggiate due dosi challenge di MMC: 333 ng/ml e 500 ng/ml. Le esposizioni a RF sono state condotte al SAR di 0.3 W/kg e 1.25 W/kg (dose adattante).

Gli effetti sull'induzione di MN e sulla proliferazione sono riportati in tabella 5.7 e 5.8, rispettivamente.

I risultati, analizzati mediante il test del *t* di Student per dati appaiati, mostrano che sia la sham-esposizione sia l'esposizione a RF, per entrambi i valori di SAR impiegati, non alterano i parametri esaminati. In figura 5.6 vengono riportati i risultati relativi alle frequenze di MN nei tre esperimenti. Si evidenzia invece un incremento di MN dose-dipendente nei trattamenti con la sola MMC ($p < 0.05$) e una riduzione dell'indice di proliferazione, ma solo nel caso della dose di 500 ng/ml ($p < 0.05$).

Nel caso dei trattamenti combinati si riscontra che la pre-esposizione al SAR di 0.3 W/kg non ha alcun effetto sull'induzione del danno da MMC per entrambe le dosi saggiate. Dall'analisi delle colture pre-esposte a 1.25 W/kg ha evidenziato (figura 5.7) una riduzione statisticamente significativa del danno indotto dai trattamenti con 500 ng/ml di MMC, con un decremento medio di MN del $43 \pm 6\%$ ($p < 0.05$, test Z), ma non di quello indotto dai trattamenti alla dose minore.

Questi risultati mostrano che il fenomeno dell'adattamento da RF non è limitato a cellule primarie quali i linfociti umani ma si riscontra anche in linee cellulari stabilizzate, sebbene in quest'ultimo caso siano richieste condizioni sperimentali più spinte, sia in termini di pre-trattamento (SAR) che di dose challenge.

Trattamento	Esperimento		
	# 1	# 2	# 3
Controllo	14	11	7
MMC (333ng/ml)	32	30	34
MMC (500ng/ml)	43	42	50
RF o Sham, SAR 0,3 W/kg			
Sh	14	12	8
Sh+333ng/ml	36	35	34
% riduzione	-12,5	-12,9	2,86
p (test-Z)	0,34	0,738	0,50
Sh+500ng/ml	42	39	52
% riduzione	2,33	9,30	-1,96
p (test-Z)	0,218	0,422	0,573
RF	18	12	8
RF+333ng/ml	34	33	39
% riduzione	5,56	-6,40	-11,40
p (test-Z)	0,410	0,666	0,586
RF+500ng/ml	40	42	44
% riduzione	14,89	2,33	13,73
p (test-Z)	0,220	0,500	0,281
RF o Sham, SAR 1,25 W/kg			
Sh	14	12	8
Sh+333ng/ml	36	35	34
% riduzione	-12,50	-12,90	2,86
p (test-Z)	0,340	0,738	0,500
Sh+500ng/ml	42	39	52
% riduzione	2,33	9,30	-1,96
p (test-Z)	0,218	0,422	0,573
RF	11	13	9
RF+333ng/ml	29	37	40
% riduzione	0	-15,63	-11,11
p (test-Z)	0,500	0,733	0,662
RF+500ng/ml	24	26	26
% riduzione	40,00	40,91	50,00
p (test-Z)	0,030	0,031	0,034

Tabella 5.7 - Micronuclei osservati in colture di V79 esposte a RF/Sham al SAR di 0.3 e 1.25 W/kg +/- MMC 333 ng/ml e 500 ng/ml. Per ogni trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate.

Trattamento	Esperimento		
	# 1	# 2	# 3
Controllo	1,70	1,67	1,48
MMC 333ng/ml	1,35	1,40	1,35
MMC 500ng/ml*	1,48	1,33	1,30
RF o Sham, SAR 0,3 W/kg			
Sh	1,60	1,66	1,51
Sh+333ng/ml	1,40	1,33	1,38
Sh+500ng/ml*	1,37	1,34	1,30
RF	1,59	1,60	1,60
RF+333ng/ml	1,50	1,46	1,26
RF+500ng/ml*	1,39	1,30	1,42
RF o Sham, SAR 1,25 W/kg			
Sh	1,60	1,66	1,51
Sh+333ng/ml	1,40	1,33	1,38
Sh+500ng/ml*	1,37	1,34	1,30
RF	1,53	1,59	1,51
RF+333ng/ml	1,46	1,40	1,32
RF+500ng/ml*	1,40	1,37	1,26

Tabella 5.8 - Indice di proliferazione in colture di V79 esposte a RF/Sham al SAR 0.3 e 1.25 W/kg +/- MMC 333 ng/ml (CD1) o 500 ng/ml (CD2). Per ogni trattamento sono state analizzate 1000 cellule. *p<0.05 (t di Student per dati appaiati).

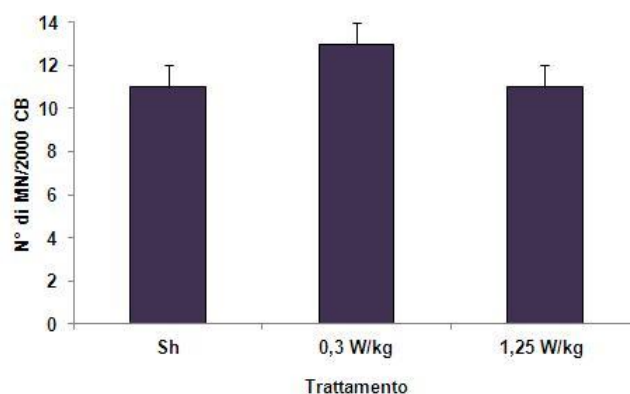


Figura 5.6 - MN in colture di V79 sham-esposte e esposte a RF a SAR di 0.3 e 1.25 W/kg. Per ogni trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. I risultati sono presentati come media ± DS di tre esperimenti indipendenti.

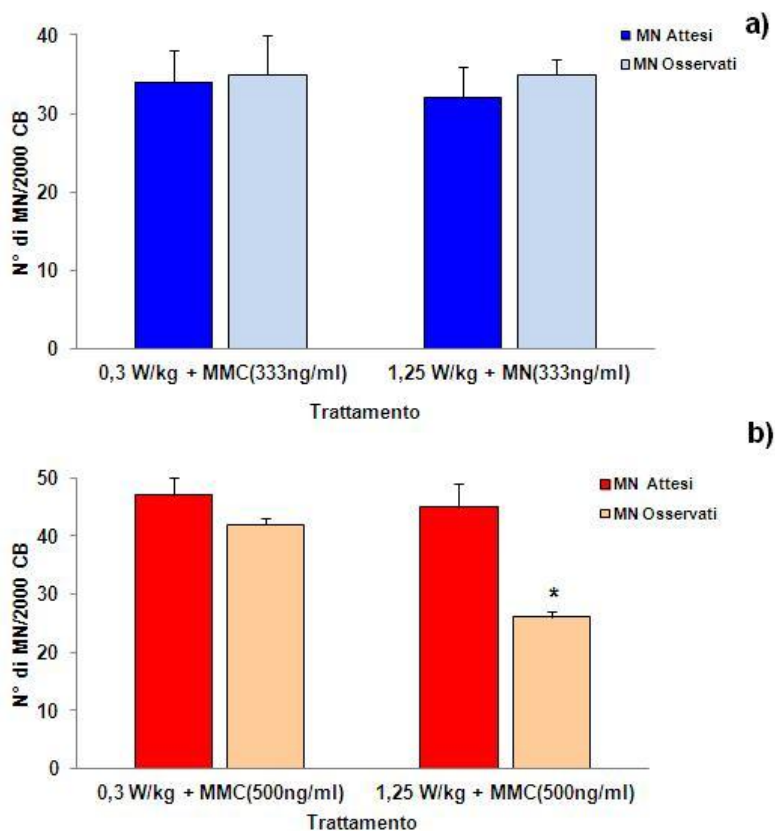


Figura 5.7 - MN attesi e MN osservati in colture di V79 pre-esposte a RF/Sham + MMC alla dose di 333 ng/ml (pannello a) e di 500 ng/ml (pannello b). Per ogni trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. I risultati sono presentati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. MN osservati vs MN attesi: * $p < 0.05$ (test Z).

5.5 Valutazione dei possibili meccanismi di azione alla base della RA indotta da RF

I risultati riportati in letteratura sulla RA indotta da noti agenti danneggianti (radiazioni ionizzanti, mutageni chimici) non hanno ancora fornito una risposta univoca sui possibili meccanismi molecolari alla base di tale fenomeno, sebbene recentemente sia stato suggerito che potrebbero essere coinvolti la regolazione del ciclo cellulare, l'induzione di apoptosi, il sistema di riparo del DNA e l'efficienza dei sistemi di detossificazione da radicali liberi (Dimova et al., 2008).

Sulla base di queste considerazioni è stato valutato se, anche nel caso della RA indotta da RF, fossero coinvolti uno o più dei parametri sopra elencati. La sperimentazione è stata eseguita alla frequenza di 1950 MHz, segnale UMTS, in colture cellulari sia di V79 sia di linfociti umani.

5.5.1 Sperimentazione in colture di V79

E' stato valutato il coinvolgimento della proliferazione, della progressione nel ciclo cellulare e degli enzimi di riparo del DNA, applicando le condizioni sperimentali che sono risultate efficaci ad indurre adattamento (SAR di 1.25 W/kg; 500 ng/ml di MMC).

I risultati ottenuti dall'analisi della vitalità (test del Tripan Blue) di tre esperimenti indipendenti indicano che non si riscontrano variazioni nelle colture sham-esposte e in quelle esposte alla RF rispetto alle colture di controllo. Si evidenzia invece una riduzione statisticamente significativa nel numero di cellule in tutti i campioni trattati con 500 ng/ml di MMC rispetto a quelli non trattati (ANOVA per misure ripetute: $p < 0.05$), come riportato in figura 5.8. Tale riduzione non era associata a mortalità cellulare, infatti la percentuale di cellule vitali in tutti i trattamenti non era mai inferiore al 94%. Dal punto di vista dei trattamenti combinati non si osservano ulteriori effetti.

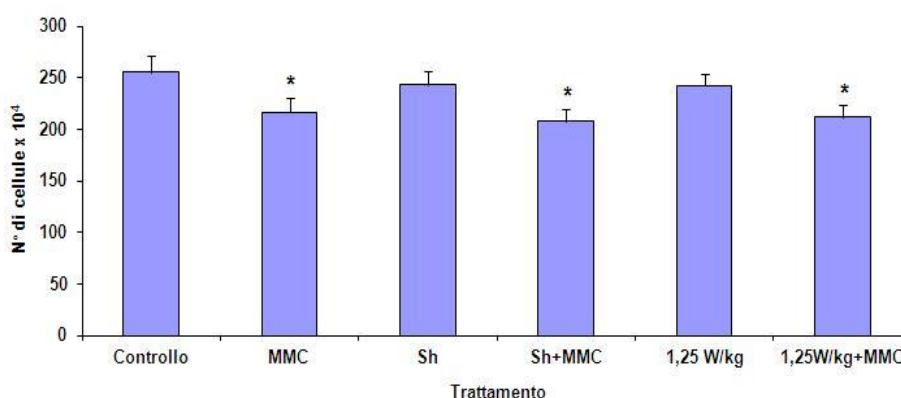


Figura 5.8 - Numero di cellule V79 vitali (tripan blue) in seguito ai trattamenti (MMC: 500 ng/ml; SAR: 1.25 W/kg). I risultati sono presentati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. MMC vs. Controllo, Sh + MMC vs. Sh, 1.25 W/kg + MMC vs. 1.25 W/kg: * $p < 0.05$ (ANOVA per misure ripetute).

Questi risultati sono confermati dall'analisi citofluorimetrica (marcatura con propidio) del ciclo cellulare: anche in questo caso le variazioni statisticamente significative verso i rispettivi controlli si riscontrano solo nei campioni trattati con MMC (ANOVA per misure ripetute: $p < 0.05$). In particolare, si evidenzia un arresto in fase G2/M per entrambe le dosi di MMC impiegate, in assenza di ulteriori effetti nelle colture che hanno subito i trattamenti combinati. In tabella 5.9 sono riportate le percentuali di cellule in fase G0/G1, S e G2/M, ottenute dopo 48 ore di coltura ed espresse come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti, mentre in figura 5.9 sono mostrati i citogrammi di un esperimento rappresentativo per tutte le condizioni sperimentali adottate.

Trattamento	Fasi del ciclo (%)		
	G0/G1	S	G2/M
Controllo	65,55 \pm 7,14	16,25 \pm 4,88	18,00 \pm 2,26
MMC	26,35 \pm 13,51*	26,45 \pm 6,86*	46,75 \pm 6,58*
Sh	63,30 \pm 8,20	18,00 \pm 5,80	18,50 \pm 2,26
Sh+MMC	27,00 \pm 13,00*	28,00 \pm 6,00*	45,00 \pm 6,00*
1,25W/kg	65,10 \pm 9,33	17,50 \pm 5,66	17,30 \pm 3,82
1,25W/kg+MMC	22,00 \pm 4,17*	29,0 \pm 2,47*	49,00 \pm 6,51*

Tabella 5.9 - Analisi del ciclo cellulare dopo 48 ore di crescita in colture di V79 esposte a RF (1.25 W/kg) e trattate con 500 ng/ml di MMC. I risultati sono presentati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. * $p < 0.05$ (ANOVA per misure ripetute).

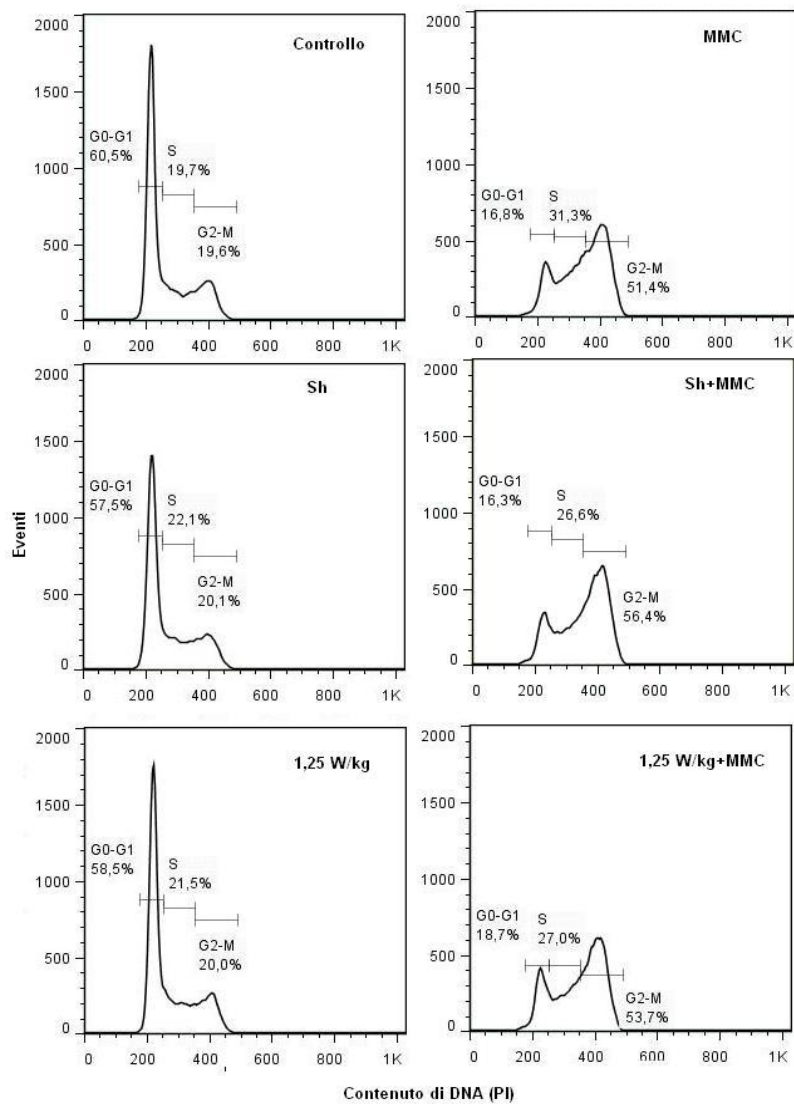


Figura 5.9 - Analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di un esperimento rappresentativo. Per ciascun trattamento sono stati acquisiti 20000 eventi.

I risultati dei tre esperimenti con e senza trattamento con 3AB, relativi all'analisi dei MN e all'indice di proliferazione, sono riportati in tabella 5.10 e 5.11, rispettivamente.

	Esperimento		
	# 1	# 2	# 3
Controllo	10	17	15
MMC	40	55	45
Sh	9	14	13
Sh+MMC	39	57	40
% riduzione	0,00	-9,60	6,90
p (test-Z)	0,500	0,692	0,354
RF	14	14	13
RF+MMC	28	32	26
% riduzione	36,00	38,46	39,50
p (test-Z)	0,046	0,032	0,036
Controllo + 3AB	12	14	13
MMC+3AB	39	45	42
Sh+3AB	10	17	14
Sh+MMC+3AB	42	54	44
% riduzione	-13,00	-12,50	-2,30
p (test-Z)	0,653	0,637	0,575
RF+3AB	14	12	15
RF+MMC+3AB	42	50	40
% riduzione	-2,40	-16,20	9,00
p (test-Z)	0,500	0,708	0,351

Tabella 5.10 - Micronuclei osservati in colture di V79 esposte a RF/Sham (1.25 W/kg +/- 500 ng/ml MMC) in presenza e in assenza di 3 AB (2mM). Per ogni trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate.

Trattamento	Esperimento		
	# 1	# 2	# 3
Controllo	1,38	1,42	1,46
MMC*	1,28	1,30	1,30
Sh	1,40	1,41	1,50
Sh+MMC*	1,34	1,29	1,40
RF	1,40	1,49	1,42
RF+MMC*	1,34	1,40	1,29
Controllo+3AB	1,42	1,38	1,40
MMC+3AB*	1,25	1,26	1,30
Sh+3AB	1,39	1,47	1,42
Sh+MMC+3AB*	1,29	1,32	1,30
RF+3AB	1,43	1,51	1,40
RF+MMC+3AB*	1,25	1,26	1,28

Tabella 5.11 – Indice di proliferazione in colture di V79 esposte a RF/ Sham al SAR di 1.25 W/kg +/- MMC 500 ng/ml. Per ogni trattamento sono state analizzate 1000 cellule. *p<0.05 (t di Student per dati appaiati).

In figura 5.10 viene mostrata la media dei MN attesi e osservati nei trattamenti combinati, dove si evidenzia che in assenza di 3AB viene confermata l'induzione di RA riportata nel paragrafo precedente (5.4). Quando però il trattamento viene eseguito in presenza di una dose sub-tossica di 3AB (2 mM), tale effetto viene annullato. Comunque, nelle colture che sono sottoposte ad un solo trattamento (controllo, sham-esposizione, esposizione a RF, trattamento con MMC) la 3AB non induce effetti, sia in termini di danno al DNA (tabella 5.10) che di proliferazione (tabella 5.11).

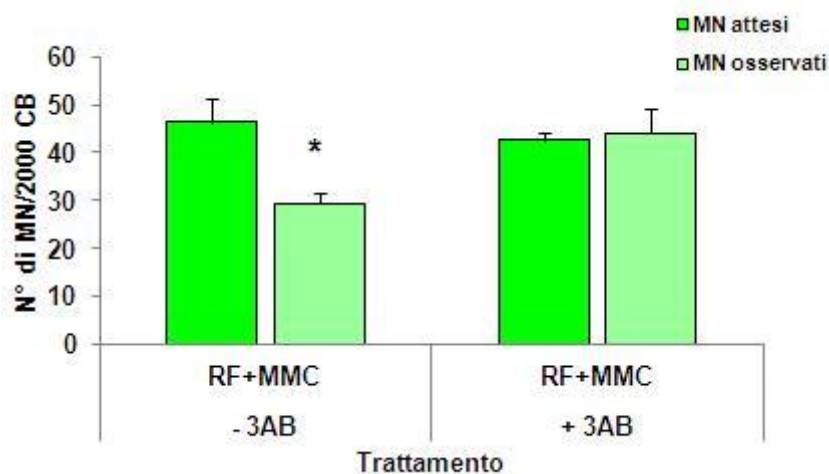


Figura 5.10 - MN attesi e MN osservati in colture di V79 pre-esposte (RF/ Sham + MMC) +/- 3AB. Per ogni trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. I risultati sono presentati come media \pm DS di tre esperimenti indipendenti. MN osservati vs MN attesi: * $p < 0.05$; test Z.

5.5.2 Sperimentazione in colture di linfociti umani da sangue periferico

Per validare i risultati in termini di vitalità, ciclo cellulare e riparo del DNA ottenuti in colture di V79, è stata condotta una analoga sperimentazione impiegando colture di linfociti umani isolati da buffy coat. In questo caso è stata anche valutata l'apoptosi col test dell'annexina/propidio.

In una fase preliminare è stato verificato che colture di linfociti isolati da buffy coat (IL) rispondono ai trattamenti combinati di RF (1950 MHz, 0.3 W/kg) e di MMC (100 ng/ml) allo stesso modo delle colture di sangue intero (WB) dello stesso individuo, come mostrato in figura 5.11, dove si riportano le percentuali di riduzione dell'induzione di MN in tre donatori (D22, D23, D24). E' interessante notare che la riduzione del danno al DNA si osserva solo nelle colture WB, quando i pre-trattamenti erano fatti con basse dosi di MMC (1 ng/ml) (figura 5.11 a), mentre le pre-esposizioni con la RF, inducevano riduzione del danno al DNA sia nelle colture WB che IL (figura 5.11 b).

Per le colture di linfociti isolati, i risultati relativi alla vitalità e al numero di cellule, ottenuti mediante test del Tripan blue, non evidenziano effetti per tutti i trattamenti eseguiti, incluso quelli combinati (ANOVA per misure ripetute: $p > 0.05$), come mostrato in figura 5.12 dove sono riportate le medie e le deviazioni standard dei tre donatori esaminati (D25, D26, D27).

Risultati analoghi sono stati ottenuti quando è stata eseguita l'analisi del ciclo cellulare, dove non si riscontrano effetti per tutti i trattamenti eseguiti, come riportato in figura 5.13.

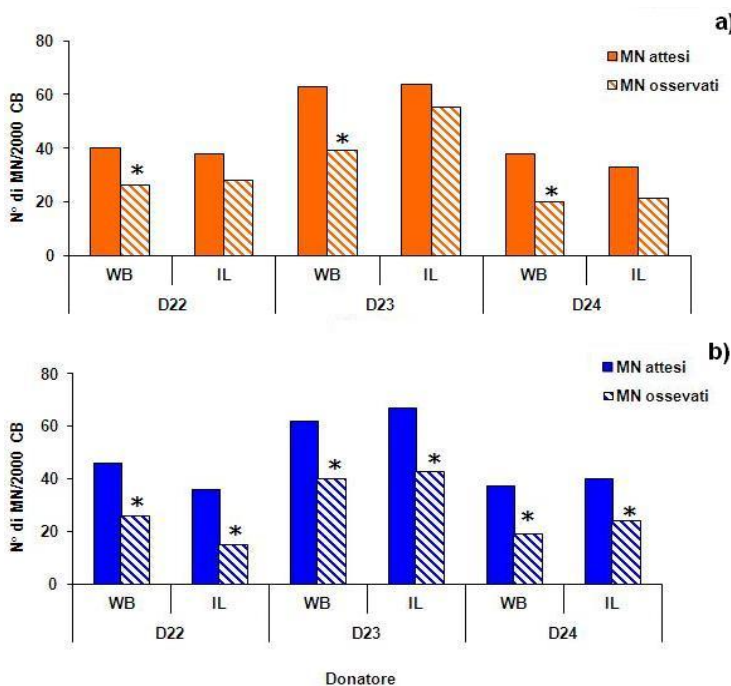


Figura 5.11 - MN attesi ed osservati in colture di linfociti umani da sangue intero (WB) e isolati da Buffy coat (IL) che hanno subito un pre-trattamento con 1 ng/ml di MMC (a) o con RF, SAR di 0.3 W/kg (b) e che sono state successivamente trattate con 100 ng/ml di MMC. Per ogni soggetto/trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: * $p < 0.05$ (test Z).

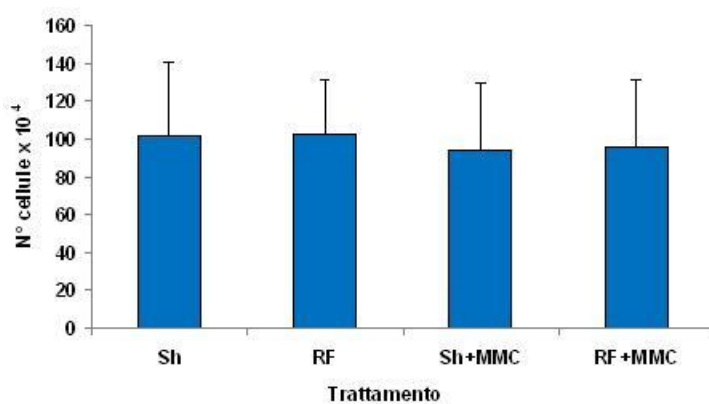


Figura 5.12 - Numero di cellule vitali in colture di linfociti separati per i vari trattamenti. I risultati sono presentati come media \pm DS degli esperimenti da tre donatori (D25-D27).

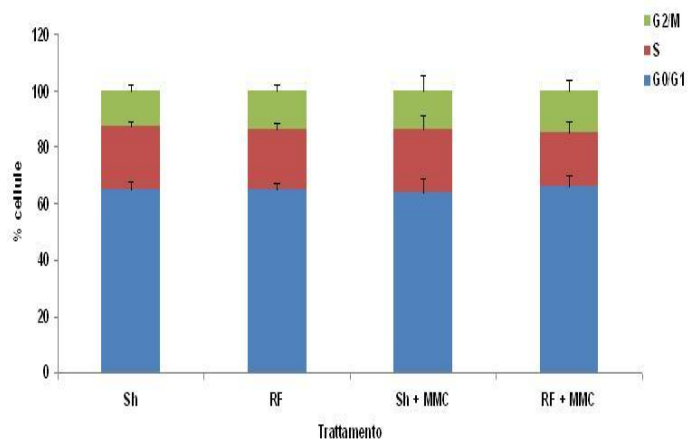


Figura 5.13 - Percentuale di cellule in fase G0/G1, S, G2/M del ciclo cellulare in colture di linfociti separati. I risultati sono presentati come media \pm DS degli esperimenti da tre donatori (D25-D27).

Anche l'apoptosi non è risultata alterata per tutti i trattamenti effettuati, come mostrato in tabella 5.12. I citogrammi rappresentativi ottenuti dal donatore D27 sono riportati in figura 5.14.

La variabilità che si riscontra nei tre endpoints analizzati (figure 5.12 - 5.14) è legata alla variabilità individuale dei donatori.

Trattamento	% cellule			
	Vitali	apoptotiche precoci	apoptotiche tardive	necrotiche
Sh	79,53±3,00	8,16±2,20	3,71±1,11	8,60±0,51
Sh+MMC	78,87±3,12	8,54±2,94	2,96±0,76	9,63±0,70
RF	79,26±1,63	7,97±1,32	2,49±1,11	10,30±1,16
RF+MMC	78,87±5,44	8,32±2,30	2,92±1,84	9,97±3,94

Tabella 5.12 – Percentuale di cellule vitali, apoptotiche e necrotiche (annexina V-FITC/PI) in colture di linfociti da tre donatori (D25, D26, D27) dopo 72 ore dalla stimolazione con PHA. I risultati sono riportati come media ± DS.

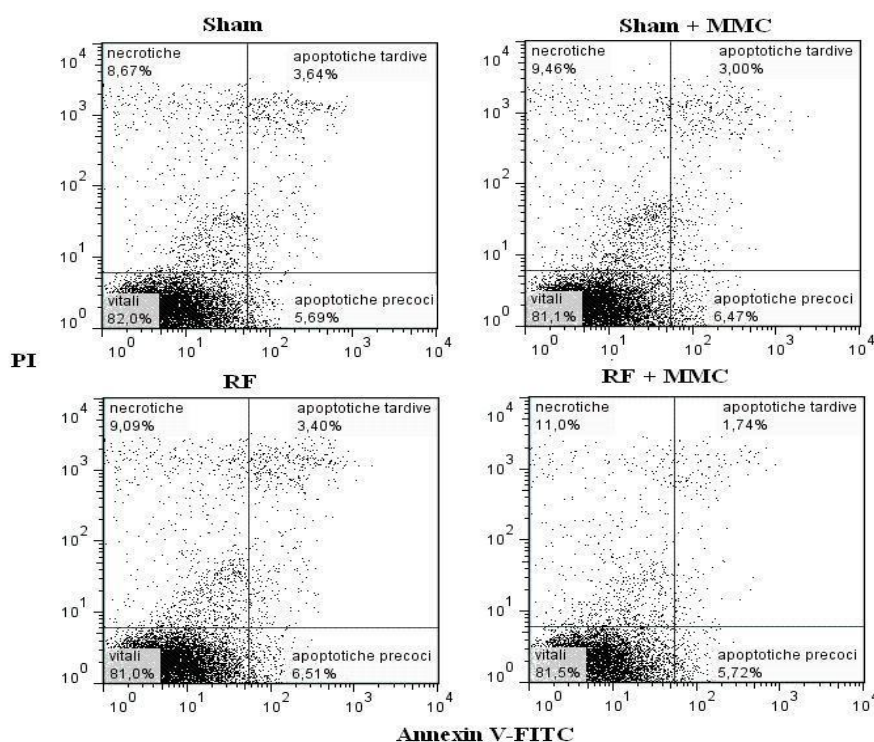


Figura 5.14 - Valutazione dell'apoptosi. Citogrammi rappresentativi dal donatore D27; Q1-Q4 rappresentano la percentuale di cellule morte, apoptotiche tardive, apoptotiche precoci, vitali, rispettivamente.

Dall'analisi dei MN attesi ed osservati nelle colture che avevano ricevuto i trattamenti combinati in presenza ed in assenza di 3AB, si evidenzia chiaramente l'annullamento dell'adattamento in presenza di 3AB (figura 5.15), confermando i risultati ottenuti in colture di V79.

Nell'insieme, i risultati ottenuti in due diversi tipi cellulari (colture primarie di linfociti umani e colture stabilizzate di fibroblasti di roditore) indicano che i meccanismi di azione alla base della risposta adattativa indotta da RF non coinvolgono la vitalità, il ciclo cellulare e l'apoptosi. Invece si evidenzia un possibile ruolo degli enzimi di riparo del DNA nell'induzione del fenomeno. Infatti, in colture cellulari trattate con 3AB, che inibisce il legame della poli(ADP-ribosio) polimerasi alla cromatina, non si osserva adattamento.

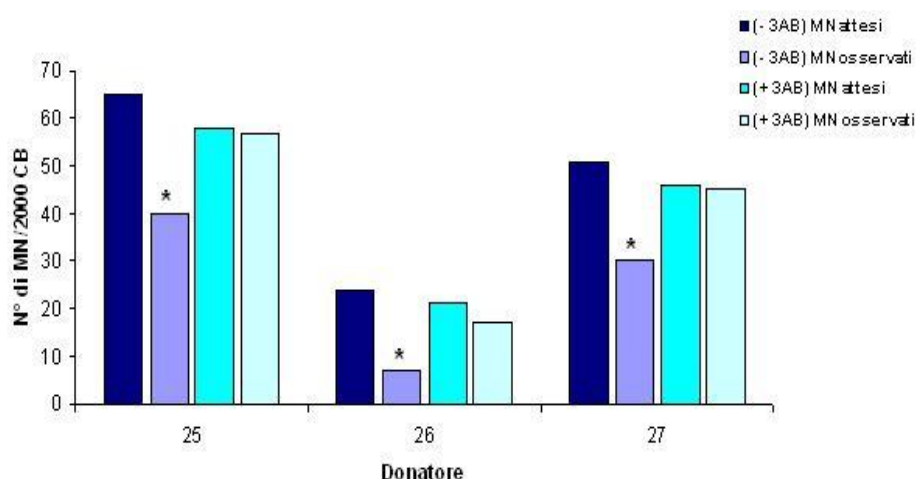


Figura 5.15 - MN attesi e MN osservati in colture di linfociti separati pre-esposte a RF e trattate con MMC,+/- 3AB. Per ogni trattamento sono state analizzate 2000 cellule binucleate. MN osservati vs MN attesi: *p<0.05 (test Z).

CAPITOLO 6

Discussione e conclusioni

La RA è un fenomeno ben noto in natura per il quale esposizioni a dosi molto basse e non tossiche (dose adattante), di un agente genotossico, inducono resistenza contro un successivo trattamento tossico (dose *challenge*) dello stesso o altro tipo di agente.

Questo fenomeno è stato riscontrato in cellule umane e animali, *in vivo* e *in vitro*, principalmente mediante test di genotossicità (micronuclei, aberrazioni cromosomiche, scambi cromatidici, comete, etc) ed è stato ben descritto in letteratura per trattamenti sia con radiazioni ionizzanti sia con noti mutageni chimici, sebbene non ci sia ancora un meccanismo universalmente riconosciuto che giustifichi l'insorgenza di questo fenomeno.

Nel 2009 presso il laboratorio di bioelettromagnetismo del CNR-IREA è stato dimostrato per la prima volta che anche campi elettromagnetici non ionizzanti sono in grado di indurre adattamento. Infatti, colture di linfociti umani esposte per 20 ore in fase S del ciclo cellulare alla frequenza di 900 MHz, modulazione GSM e SAR di 1.25 W/kg mostravano una riduzione del danno indotto al DNA da successivi trattamenti con MMC valutato mediante il test del micronucleo (Sannino et al., 2009). L'interesse per tale risultato deriva dal fatto che i campi elettromagnetici non ionizzanti non sono in grado di indurre danno diretto al DNA (Verschaeve 2010; Vijayalaxmi and Prihoda, 2012), ma sono risultati efficaci nell'evocare RA.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di caratterizzare la RA indotta da RF in colture cellulari di mammifero e di individuare i possibili meccanismi alla base di tale fenomeno.

In una fase iniziale è stata confermata l'insorgenza di RA su un numero maggiore di donatori. Inoltre, è stato dimostrato che le esposizioni a RF sono efficaci nell'indurre adattamento solo se le colture sono esposte nella fase S del ciclo cellulare, mentre cellule esposte in fase G0 e G1 non mostrano riduzione del danno da MMC. La letteratura sulla RA da radiazioni ionizzanti indica che il fenomeno è indipendente dalla fase del ciclo cellulare in cui viene erogata la dose adattante (Fan et al., 1990; Ryabchenko et al., 1998). Questa apparente discrepanza origina probabilmente dalla natura dell'agente adattante impiegato: la RF non è genotossica e quindi è efficace solo se erogata in una fase sensibile del ciclo cellulare (Sannino et al., 2011). Per caratterizzare ulteriormente il fenomeno, è stato utilizzato un sistema di esposizione a RF in cui le colture cellulari possono essere esposte a differenti frequenze, modulazioni e differenti SAR. In particolare, è stata impiegata la frequenza di 1950 MHz con la tecnologia UMTS, la più utilizzata per l'implementazione dei sistemi di telefonia di terza generazione, e sono stati saggiate diversi valori di SAR, incluso il valore di 1.25 W/kg che era risultato efficace nell'indurre RA a 900 MHz. La sperimentazione è stata eseguita impiegando colture di linfociti umani da sangue intero ed anche in questo caso, è stata riscontrata riduzione del danno al DNA indotto da un successivo trattamento con MMC in linfociti umani, ma solo ad un SAR di 0.3 W/kg. Evidentemente l'induzione di RA è legata sia al SAR che alla frequenza. Inoltre questo risultato avvalorava anche la natura non termica del fenomeno osservato. Infatti per SAR maggiori (0.6 e 1.25 W/kg) non si evidenziava adattamento (Zeni et al., 2012). L'efficacia delle condizioni sperimentali impiegate nell'induzione di RA in colture da sangue intero è stata anche confermata in colture di linfociti isolati da buffy

coat, allestite da prelievi di sangue periferico degli stessi donatori. In quest'ultimo caso è interessante notare che la riduzione del danno al DNA si osservava solo quando i pre-trattamenti venivano eseguiti con la RF, ma non con basse dosi di MMC. Probabilmente la MMC, sebbene in dosi non genotossiche (1 ng/ml), era comunque citotossica in colture cellulari deprivate di eritociti, a nota azione antiossidante.

Il segnale UMTS al SAR di 0.3 W/kg è stato dimostrato efficace nell'indurre RA anche nei confronti del danno al DNA indotto da raggi X alla dose di 1.5 Gy. Tale risultato indica che l'efficacia della RF non è correlata al meccanismo di azione dell'agente genotossico impiegato come dose challenge. Infatti, si è riscontrata RA sia con MMC, un potente mutageno bi-funzionale che agisce da agente alchilante inducendo cross-link (Ueda et al, 1984; Tomasz M, 1987; Tomasz et al., 1987) sia con i raggi X che inducono prevalentemente danno diretto alla singola e doppia elica del DNA e, in misura minore, danno indiretto mediante formazione di specie reattive dell'ossigeno (Hall and Garcia, 2012).

Dalle sperimentazioni eseguite si evidenzia inoltre che la RF è anche in grado di indurre adattamento in colture cellulari stabilizzate di fibroblasti polmonari di roditore (V79), indicando che il fenomeno non è dipendente dal tipo cellulare impiegato, sebbene in questo caso siano richieste condizioni sperimentali più spinte rispetto a quelle impiegate per i linfociti umani (SAR di 1.25 W/kg come dose adattante e 500 ng/ml di MMC come dose challenge). Questi risultati sono in accordo con dati riportati in letteratura, che mostrano che per indurre danno al DNA in colture di V79 devono essere impiegate dosi di mutageni maggiori rispetto a quelle richieste in altri tipi cellulari (Ikushima et al., 1996).

Per quanto riguarda i possibili meccanismi di azione alla base della risposta adattativa da radiazioni ionizzanti, in letteratura sono riportate diverse ipotesi. Una delle più accreditate propone che la dose adattante induce un più efficace riparo del DNA, suggerendo che possano essere indotti meccanismi di riparo, aumentando la resistenza cellulare al danno indotto dalla dose challenge (Wiencke et al., 1986; Ikushima et al, 1986; Vijayalaxmi and Burkart, 1989; Kleczkowska and Althaus, 1996). Inoltre, è stato anche suggerito il coinvolgimento di: a) incrementata sintesi proteica (Youngblom et al., 1989; Kim et al., 1996), b) cambiamenti nella conformazione della cromatina (Belyaev et al., 1996), c) alterata espressione genica (Martin et al., 1995; Rigaud et al., 1996), d) ritardo mitotico e regolazione del ciclo cellulare (Salone et al., 1996; Meyers et al., 1994).

Sulla base di tali ipotesi, valide per l'adattamento da radiazioni ionizzanti, è stato valutato il coinvolgimento del riparo del DNA, dell'apoptosi e della progressione nel ciclo cellulare per fare luce sui possibili meccanismi alla base dell'adattamento indotto da RF. Non sono stati riscontrati alterazioni del ciclo cellulare e dell'apoptosi, mentre si delinea il possibile coinvolgimento dei meccanismi di riparo del DNA. Infatti, sia in colture di fibroblasti di roditore (V79) sia in colture di linfociti umani il trattamento con 3-Aminobenzamide, un inibitore di PARP, era in grado di annullare l'effetto protettivo del pre-trattamento con RF.

E' interessante osservare che ad oggi, la RA da RF è stata anche confermata da altri gruppi di ricerca indipendenti. Il gruppo di Cao ha valutato, in topi, l'effetto di pre-esposizioni a RF (900 MHz, 120 μ W/cm², onda continua), di 1 h al giorno per 14 giorni, sul danno indotto da 5-Gy di raggi gamma. I risultati, confrontati con quelli ottenuti in animali trattati solo con raggi gamma, hanno mostrato un aumento della sopravvivenza, un ridotto danno emopoietico, un decremento del danno al DNA e una aumentata espressione di geni correlati al ciclo cellulare [Cao et al., 2010, 2011; Jiang et al., 2012]. Un aumento della sopravvivenza in topi e ratti pre-esposti a RF (900 MHz, 2 W/kg, segnale GSM) e trattati con raggi gamma è stato anche

riscontrato dal gruppo di ricerca di Mortazavi [2011, 2012]. Inoltre, recentemente è stato riportato, in vitro, che colture cellulari di HL-60 pre-esposte a 900 MHz e poi trattate con doxorubicina mostravano un incremento della proliferazione, del potenziale di membrana mitocondriale e dell'ATPasi Calcio e Magnesio-dipendente e un decremento di apoptosi e di calcio intracellulare (Jin et al., 2012). Questi risultati confermano le osservazioni riportate in questo lavoro di tesi estendole agli studi in vivo.

In conclusione, l'interessante risultato di queste indagini di caratterizzazione della RA indotta da RF è che esposizioni a campi elettromagnetici non ionizzanti alle frequenze in uso per la telefonia cellulare, nelle condizioni sperimentali adottate, sono effettivamente efficaci nell'offrire protezione nei confronti di agenti mutageni agendo a livello dei complessi meccanismi di riparo del danno al DNA. Inoltre, nell'ambito dello studio più ampio degli effetti cooperativi tra campi elettromagnetici non ionizzanti e agenti mutageni, i risultati dimostrano l'esistenza di un'interazione, in vitro, con cellule di mammifero. Questa osservazione, confermata dai recenti studi in vivo, rappresenta un punto di partenza per esplorare la possibilità di utilizzare i campi elettromagnetici a RF per applicazioni innovative in diagnostica e terapia.

Abdollahi H, Teymouri M, Khademi S. **2012**. Radiofrequency radiation may help astronauts in space missions. *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* **6**:66-69.

Azzam EI, de Toledo SM, Raaphorst GP, and Mitchel REJ. **1992**. Radiation-induced radioresistance in a normal human fibroblast cell line. In *Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms*. Edited by Sugahara T, Sagan LA, and Aoyama T. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 291-294.

Azzam EI, Raaphorst GP, and Mitchel REJ. **1994**. Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastitrasformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cells. *Radiat Res* **138**:S28-31.

Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Islami F, Galichet L, Straif K. **2011**. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *The Lancet Oncology* **12**: 624-626.

Bauchinger M, Schmid E, Braselmann H and Nahrstedt U. **1989**. Absence of adaptive response to low-level irradiation from tritiated thymidine and X-rays in lymphocytes of two individuals examined in serial experiments. *Mutat Res* **227**:103-107.

Belyaev I Y, Spivak I M, Kolman A, Harms-Ringdahl M. **1996**. Relationship between radiation induced adaptive response in human fibroblasts and changes in chromatin conformation. *Mutat Res* **358**:223-230.

Bender MA, Awa AA, Brooks AL, Evans HJ, Groer PG, Littlefield LG, Pereira C, Preston RJ, Wachholz BW. **1988**. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. *Mutat Res* **196(2)**:103-159.

Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P, Camurri L, Dalpra L, De Ferrari M, Forni A, Lando C, et al. **1995**. Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4(6)**:671-9.

Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, Heikkila P, Wanders S, Wilhardt P, Hansteen IL, Knudsen LE, Norppa H. **2000** Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res* **60(6)**:1619-25.

Bosi A G, Olivieri G. **1989**. Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans. *Mutat Res* **211**:13-17.

Bongiorno V, Pennarola R, d'Ambrosio G, De Martino F, Scaglione A, Cuomo F. **1984**. Risultati di esposizioni intense a microonde della banda 15 GHz sull'apparato oculare del coniglio. *Giorn. it. oftamol. Occupaz* **2**:549-554.

Brescia F, Sarti M, Massa R, Calabrese ML, Sannino A, Scarfi MR. **2009**. Reactive Oxygen Species Formation Is Not Enhanced by Exposure to UMTS1950 MHz Radiation and Co-Exposure to Ferrous Ions in Jurkat Cells. *Bioelectromagnetics* **30**:525-535.

Cai L, Liu SZ. **1990**. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* **58(1)**:187-194.

Calabrese ML, d'Ambrosio G, Massa R, Petraglia G. **2006**. A High-Efficiency Waveguide Applicator for In Vitro Exposure of Mammalian Cells at 1.95 GHz". *IEEE Trans Microw Theory Tech* vol. **54(5)**:2256-2264.

Cao Y, Qian X, Zong-Da J, Jun Z, Min-Xia L, Ji-Hua N and Tong J. **2010**. Effects of 900-MHz Microwave Radiation on γ -Ray-Induced Damage to Mouse Hematopoietic System. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **73(7)**: 507-513.

Cao Y, Qian X, Zong-Da J, Zhen Z, Ji-Hua N and Tong J. **2011**. Induction of adaptive response: Pre-exposure of mice to 900 MHz radiofrequency fields reduces hematopoietic damage caused by subsequent exposure to ionising radiation. *Int J Radiat Biol* **87**: 720–728.

Chou CK, Bassen H, Osepchuk J, Balzano Q, Peterson R, Meltz M, Cleveland R, Iin JC, Heynick L. **1996**. Radiofrequency electromagnetic exposure: tutorial review on experimental dosimetry. *Bioelectromagnetics* **17**:195-208.

Dimova EG, Bryant PE and Chankova SG. **2008**. Adaptive response - Some underlying mechanisms and open questions. *Genetics and Molecular Biology* **31(2)**: 396-408.

Fan S, Vijayalaxmi, Mindek I G and Burkart W. **1990**. Adaptive response to 2 low doses of X-rays in human blood lymphocytes. *Mutation Res* **243**: 53-56.

Farooqi Z, and Kesavan PC. **1993**. Low-dose radiation-induced adaptive response in bone marrow cells of mice. *Mut Res* **302**:83-89.

Fenech M and Morley AA. **1986**. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose-X irradiation. *Mutation Res* **148**: 99-105.

Fenech M. **2005**. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* **111**: 3-32.

Fenech M **2007**. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay *Nature Protocols* **2**: 1084-1104.

Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, et al. **1994**. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* **54(11)**:2919-22.

Hall EJ and Garcia AJ. **2012**. Molecular mechanisms of DNA and chromosome damage and repair. In: *Radiobiology for the Radiologist*. Eds: Hall EJ and Garcia AJ. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA. Chapter **2**:12-35.

Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G and Lewis D. **2002**. Good Cell Culture Practice ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1 ATLA **30**: 407-414.

Huber R, Salassidis K, Kulka U, Braselman H, Bauchinger M, **1996**, Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes with an a satellite pancentromeric DNA probe. *Envir Mol Mut* **27**:105-109.

IARC 2012. Monograph Series, Vol. 102 in stampa.

ICNIRP. **1998**. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields. *Health Physics* **74**:494-522.

Ikushima T. **1987**. Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* **180**: 215-221.

Ikushima T, Aritomi H, Morisita J. **1996**. Radioadaptive response: Efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res* **358**: 193-198.

Jiang B, Nie J, Zhou Z, Zhang J, Tong J, Cao Y. **2012**. Adaptive Response in Mice Exposed to 900 MHz Radiofrequency Fields: Primary DNA Damage. *PLoS ONE* **7**(2): e32040. doi:10.1371/journal.pone.0032040.

Jin Z, Zong C, Jiang B, Zhou Z, Tong J, Cao Y. **2012**. The effect of combined exposure of 900 MHz radiofrequency fields and doxorubicin in HL-60 cells, *PLoS ONE* **7** e46102.

Joksic G, Pajovic SB, Stankovic M, Pejic S, Kasapovic J, Cuttone G, Calonghi N, Masotti L and Kanazir DT. **2000**. Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation in vitro. *Cell Mol Life Sci* **57**:842-850.

Kelsey KT, Memisoglu A, Frenkel D, Liber HL. **1991**. Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis. *Mutat Res* **263**(4):197-201.

Khandogina EK, Mutovin GR, Zvereva SV, Antipov AV, Zverev DO, Akifyev AP. **1991**. Adaptive response in irradiated human lymphocytes: radiobiological and genetical aspects. *Mutat Res* **251**(2):181-186.

Kim J H, Hahm K H, Cho C K, Yoo SY. **1996**. Protein biosynthesis in low dose ionizing radiation-adapted human melanoma cells. *J Radiat Res* **37**: 161-169.

Kleczkowska HE, Althaus FR. **1996**. The role of poly(ADP-ribosyl)ation in the adaptive response. *Mutat Res* **358**:215-221.

Kratochvil E, Schwarz C, Pilger A, Adlkofer F, Rüdiger H. **2007**. DNA-damaging effects of UMTS electromagnetic fields in human cells in vitro 8th International Conference of the EBBA, Bordeaux, France.

Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate Jr M, Kirchner S, Lorge E, Wakata A. **2003**. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res* **540**:153-163.

Krishnaja AP, Sharma NK. **2008**. Variability in cytogenetic adaptive response of cultured human lymphocytes to mitomycin C, bleomycin, quinacrine dihydrochloride, Co60 {gamma}-rays and hyperthermia. *Mutagenesis* **23**:77-86.

Kuster N, Schönborn F. **2001**. Recommended minimal requirements and development guidelines for exposure setups of bio-experiments addressing the health risk concern of wireless communications"ioelectromagnetics. **21(7)**:508-514.

Madrigal-Bujaidar E, Cassani M, Martinez S, Morales T. **1994**. Adaptive response induced by mitomycin C measuring the frequency of SCEs in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **322**:301-305.

Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L. **1996**. 954 MHz microwaves enhance the mutagenic properties of mitomycin C. *Environ Mol Mutagen* **28**: 26-30.

Maes A, Collier M, Van Gorp U, Vandoninck S, Verschaeve L. **1997**. Cytogenetic effects of 935.2 MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin-C, *Mutation Res* **393**:151-156.

Martin M, Crechet F, Ramaounet B, Lefiax JL. **1995**. Activation of c-fos by low dose radiation: a mechanism of the adaptive response in skin cells. *Radiat Res* **141**:118-119.

Matsumoto H, Takahashi A and Ohnishi T. **2004**. Radiation-induced Adaptive Responses and Bystander Effects. *Biological Sciences in Space* **18(4)**:247-254.

McNamee JP, Bellier PV, Gajda GB, Miller SM, Lemay EP, Lavallée BF, Marro L, Thansandote A. **2002**. DNA Damage and Micronucleus Induction in Human Leukocytes after Acute In Vitro Exposure to a 1.9 GHz Continuous-Wave Radiofrequency Field. *Radiat Res***158**:523-533.

Meltz ML, Eagan P, Erwin DN. **1989**. Absence of mutagenic interaction between microwaves and mitomycin C in mammalian cells. *Envir and mol mut* **13**:294-303.

Meyers M, McCaffrey J, Odegaard E, Boothman D. **1994**. X-ray-inducible transcripts and altered cell cycle regulation are involved in adaptive survival responses in human cells. *Radiat Res* **141**:119-120.

Miura Y. **2004**. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res* **45**:357-372.

Moquet JE, Prosser JS, Edwards AA, Lloyd DC. **1989**. Sister-chromatid exchanges induced by mitomycin C after acute or chronic exposure of human lymphocytes to a low dose of X-rays. *Mutat Res* **227(4)**:207-213.

Mortazavi SMJ, Ikushima T and Mozdarani H. **2003**. Variability of chromosomal radioadaptive response in human lymphocytes. *Iran J Radiat Res* **1**:55-61.

Mortazavi SMJ, Mozdarani H. **2006**. The search for a possible optimum adapting dose under the optimum irradiation time scheme in cultured human lymphocytes. *Int J Low Radiation* **31(1)**:74-82.

Mortazavi SMJ, Mosleh-Shirazi MA, Namazi SAS, Ghalandari R, Bonyadi S, Shafie M. **2010**. Increase radioresistance to lethal doses of gamma rays in mice and rats after exposure to microwave radiation emitted by a GSM mobile simulator, *7th International conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas* Nov. 24-26.

Mortazavi SMJ, Mosleh-Shirazi MA, Tavassoli AR, Taheri M, Bagheri Z, Ghalandari R, Bonyadi S, Shafie M, Haghani M. **2011**. A comparative study on the increased radioresistance to lethal doses of gamma rays after exposure to microwave radiation and oral intake of flaxseed oil in Iran. *J. Radiat. Res* **9(1)**:9-14.

Mortazavi SMJ, Mosleh-Shirazi MA, Tavassoli AR, Taheri M, Mehdizadeh AR, Namazi SAS, Jamali A, Ghalandari R, Bonyadi S, Haghani M and Shafie M. **2012**. Increased radioresistance to lethal doses of gamma rays in mice and rats after exposure to microwave radiation emitted by GSM mobile phone simulator. *Int dose-response society* DOI:10.2203/dose-response.12-010.Mortazavi.

Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. **1984**. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **223**:594-597.

Olivieri G and Bosi A. **1990**. Possible causes of variability of the adaptive response in human lymphocytes in: Obe G and Natarajan AT (Eds.), *Chromosomal Aberrations: Basic and Applied Aspects*. Springer-Verlag Berlin 130- 139.

Palumbo R, Brescia F, Capasso D, Sannino A, Sarti M, Capri M, Grassilli E and Scarfi MR. **2008**. Exposure to 900 MHz Radiofrequency Radiation Induces Caspase 3 Activation in Proliferating Human Lymphocytes. *Rad Res* **170**:327–334.

Paffi A, Apollonio F, Lovisolo GA, Marino C, Pinto R, Repacholi M, Liberti M. **2010**. Considerations for developing an RF exposure system: a review for in vitro biological experiments. *IEEE Trans on Micro The and Tech* **58(10)**:2702-2714.

Pennarola R. **1997**. Effetti biologici dei campi elettromagnetici e sorveglianza medica dei lavoratori nell'esposizione a rischio. *Atti del Convegno: l'esposizione ai campi elettromagnetici nelle città*. Napoli, 12 maggio, Napoli.

Rigaud O, Papadopoulo D, Moustacchi E. **1993**. Decreased deletion mutation in radioadapted human lymphoblasts. *Radiat Res* **133(1)**:94-101.

Rigaud O, Moustacchi E. **1996**. Radio-adaptation for gene mutations and the possible molecular mechanisms of adaptive response. *Mutat Res* **358**:127-134.

Ryabchenko NI, Antoshchina MM, Fesenko EV, Ivanova TI, Kondrashova TV, Nasonova VA. **1998**. Cytogenetic adaptive response in cultured human lymphocytes: dependence on the time of exposure to adapting and challenging doses of gamma-rays. *Mutat Res* **418**:7-19.

Salone B, Pretazzoli V, Bosi A, Olivieri G. **1996**. Interaction of low-dose radiation with subsequent mutagen treatment: role of mitotic delay. *Mutat Res* **358**:155-160.

Samson L, Cairns JA. **1977**. A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. *Nature* **267**:281-283.

Sanderson BJS, and Morley AA. **1986**. Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation. *Mutat Res* **164**:347-351.

Sannino A, Calabrese ML, d'Ambrosio G, Massa R, Petraglia G, Mita P, Sarti M, Scarfi MR. **2006**. Evaluation of Cytotoxic and Genotoxic Effects in Human Peripheral Blood Leukocytes Following Exposure to 1950-MHz Modulated Signal. *IEEE Trans Plasma Sci* **34** (4):1441-1448.

Sannino A, Sarti M, Reddy SB, Prihoda TJ, Vijayalaxmi, Scarfi MR. **2009**. Induction of Adaptive Response in Human Blood Lymphocytes Exposed to Radiofrequency Radiation. *Radiat Res* **171** a:735-742

Sannino A, Di Costanzo G, Brescia F, Sarti M, Zeni O, Juutilainen J, Scarfi MR. **2009**. Human Fibroblasts and 900 MHz Radiofrequency Radiation: Evaluation of DNA Damage after Exposure and Co-exposure to 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-Hydroxy-2(5h)-furanone (MX). *Radiat Res* **171** b:743-751.

Sannino A, Zeni O, Sarti M, Romeo S, Reddy SB, Belisario A, Prihoda TJ, Vijayalaxmi, Scarfi MR. **2011**. Characterization of Radiofrequency-induced Adaptive Response in human peripheral blood lymphocytes: cell cycle effects, *Int J Rad Biol* **87**(7):1-8.

Sasaki MS, Ejima Y, Tachibana T, Ishizaki K, Shimizu T, Nomura T. **2002**. DNA damage response pathway in radioadaptive response. *Mutat Res* **504**:101-118.

Sasiadek M, Schlade-Bartusiak K, Zych M, Noga L and Czermarmazowicz H. **2002**. Opposite responses in two DNA repair capacity tests in lymphocytes of head and neck cancer patients. *J Appl Genet* **43**:525-534.

Scarfi MR, Prisco F, Bersani F, Lioi MB, Zeni O, Di Pietro R, Franceschi C, Motta M, Iafusco D, Stoppoloni G. **1996**. Spontaneous and mitomycin-C-induced micronuclei in lymphocytes from subjects affected by Turner's syndrome. *Mutat Res* **357**(1-2):183-90.

Scarfi MR, Fresegna AM, Villani P, Pinto R, Marino C, Sarti M, Sannino A, Altavista P and Lovisolo GA. **2006**. Exposure to radiofrequency radiation (900 MHz, GSM signal) does not affect micronucleus frequency and cell proliferation in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat Res* **165**: 655-663.

Schaffer M, Schwarz SB, Kulka U, Busch M, Duhmke E. **2004**. Adaptive doses of irradiation—an approach to a new therapy concept for bladder cancer? *Radiat Environ Biophys* **43**:271–276.

Schlade-Bartusiak K, Stembalska-Kozłowska A, Bernady M, Kudyba M, Sasiadek M. **2002**. Analysis of adaptive response to bleomycin and mitomycin C. *Mutation Res* **513**:75-81.

Schwarz SB, Schaffer PM, Kulka U, Ertl-Wagner B, Hell R and Schaffer M. **2008**. The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiat Oncol* **23**:3-12.

Seong J, Suh CO, Kim GE. **1995**. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **33(4)**:869-874.

Shadley JD, Afzal V, Wolff S. **1987**. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat Res* **111(3)**:511-7.

Shadley JD and Wolff S. **1987**. Very low doses of X-rays can use human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* **2(2)**:95-96.

Shadley JD, Wiencke JK. **1989**. Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol* **56(1)**:107-118.

Shadley JD, Day G. **1992**. Cytogenetic and survival adaptive response in G1 phase Human lymphocytes. *Mut Res* **265**:273-281.

Shuderer J, Spat D, Samaras T. **2004**. In vitro exposure systems for RF exposures at 900 MHz. *IEEE Trans on Microwave Theor and Tech* **5 (8)**: 2067-2075.

Stecca C, Gerber GB.1998. Adaptive Response to DNA-Damaging Agents. A review of potential mechanisms. *Biochem Pharmac* **55**:941–951.

Stoilov LM, Mullenders LHF, Darroudi F and Natarajan AT. **2007**. Adaptive response to DNA and chromosomal damage induced by X-rays in human blood lymphocytes. *Mutagenesis* **22**:117-122.

Surralles J, N. Xamena, A. Creus, J. Catalan, H. Norppa and R. Marcos. **1995**. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Res* **341**:169-184 .

Surralles J, Natarajan AT. **1997**. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Res* **392**:165-174, 1997.

Tapio S, Jacob V. **2007**. Radioadaptive response revisited. *Radiat Environ Biophys* **46**:1–12.

Tomasz M, Lipman R, Chowdary D, et al. **1987**. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* **235**:1204–1208.

Tomasz M. **1987**. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chemistry and Biology* **2**:575–579.

Ueda K, Komano T. **1984**. Sequence-specific DNA damage induced by reduced mitomycin C and 7-N-(p-hydroxyphenyl) mitomycin C. *Nucleic Acid Res* **12**:6673-6683.

Vecchia P, Matthes R, Ziegelberger G, Lin J, Saunders R, Swerdlow A. **2009**. Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz - 300 GHz). *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP)* 16/2009.

Vermes C, Haanem H, Steffens-Nakken C, Reutelingsperger. **1995**. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V, *J Immunol Meth* **184**:39-51.

Verschaeve L. **2005**. Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR). *Toxicology and Applied Pharmacology* **207**:336-341.

Verschaeve L, Juutilainen J, Lagroye I, Miyakoshi J, Saunders R, de Seze R, Tenforde T, van Rongen E, Veyret B, Xu Z. **2010**. In vitro and in vivo genotoxicity of radiofrequency fields. *Mutat Res* **705**:252-268.

Vijayalaxmi and Burkat. **1989**. Effect of 3-aminobenzamide on chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin. *Mutagenesis* **4(3)**:187-189.

Vijayalaxmi, Leal BZ, Deahl TS, Meltz ML. **1995**. Variability in adaptive response to low dose radiation in human blood lymphocytes: consistent results from chromosome aberrations and micronuclei. *Mutat Res* **348**:45-50.

Vijayalaxmi and Obe G. **2004**. Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation. *Radiat Res* **162(5)**:481-496.

Vijayalaxmi, Obe G. **2005**. Controversial cytogenetic observations in mammalian cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation. A review and future research. *Bioelectromagnetics* **26**:412-430.

Vijayalaxmi and Prihoda TJ. **2008**. Genetic Damage in Mammalian Somatic Cells Exposed to Radiofrequency Radiation: A Meta-analysis of Data from 63 Publications (1990–2005). *Radiat Res* **169**:561-574.

Vijayalaxmi and Prihoda TJ. **2012**. Genetic damage in human cells exposed to non-ionizing radiofrequency fields: A meta-analysis of the data from 88 publications (1990-2011). *Mutat Res* **749**:1-16.

Wiencke JA, Afzal V, Olivieri G, Wolff S. **1986**. Evidence that the [3H] thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of achromosomal repair mechanism. *Mutagenesis* **1**:375-380.

Wojcik A, Sauer K, Zbolzer F, Bauch T and Muller WU. **1996**. Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis* **11**:291-297.

Wojcik A, Bruckmann E, Obe G. **2004**. Insights into the mechanisms of sister chromatid exchange formation. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 104(1-4):304-9.

Wolff S. **1996**. Aspect of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mut Res* **358**:135-142.

Wolff S. **1998**. The adaptive response in radiobiology: Evolving insights and implications. *Environ Health Persp* **106**:S277-283.

Youngblom JH, Wiencke JK, Wolff S. **1989**. Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutat Res* **227(4)**:257-261.

Zeni O, Sannino A, Romeo S, Massa R, Sarti M, Reddy AB, Prihoda TJ, Vijayalaxmi, Scarfi MR. **2012**. Induction of an adaptive response in human blood lymphocytes exposed to radiofrequency fields: Influence of the universal mobile telecommunication system (UMTS) signal and the specific absorption rate. *Mutat Res* **747**:29-35.

Zhang MB, He JL, Jin LF, Lu DQ. **2002**. Study of low-intensity 2.450 MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of mitomycin C using micronucleus test and comet assay in vitro. *Biomed Environ Sci* **15**:283-290.

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento è per le due persone che mi hanno sempre seguito durante il mio percorso formativo e di crescita personale, a partire dalla tesi di laurea in scienze biologiche ad oggi con questa tesi di dottorato. Queste due persone sono la dottoressa Maria Rosaria Scarfi e la dottoressa Olga Zeni, che hanno sempre creduto, credono e crederanno in me, per le mie capacità di impegno e dedizione alla crescita del nostro gruppo di ricerca dell'IREA-CNR. Mi hanno sempre incoraggiato e sostenuto sia nei momenti felici che di sconforto, mostrandomi la via più giusta per superare gli ostacoli di vita e di lavoro. Donne esemplari nella dedizione al lavoro e alla famiglia, da cui ho potuto trarre gli insegnamenti per la mia formazione. Spero che il raggiungimento di questo obiettivo sia per noi motivo non di un addio ma di una nuova fase per la mia crescita professionale nel mondo della ricerca italiana, che come sappiamo, ad oggi, non consente ai giovani ricercatori di affermarsi.

Durante la mia crescita professionale ho incontrato altre persone a cui voglio dire mille grazie e che hanno dato tanto per consentire il raggiungimento dei miei traguardi formativi, come la professoressa Rita Massa, esemplare nella sua capacità di ascolto, disponibilità, generosità, altruismo, professionalità.

Grazie alla dottoressa Stefania Romeo, anche se da poco tempo, è un elemento importante del nostro gruppo di ricerca, subito è diventata per la sua preparazione, voglia di fare e giovinezza, un

esempio a cui far riferimento. Grazie a tutti i tesisti che hanno partecipato alla riuscita di questo progetto di ricerca.

Non posso dimenticare in questi ringraziamenti, altre due persone che hanno permesso il raggiungimento del titolo di dottorato e sono il coordinatore, la professoressa Antonietta Leone, e il mio tutor, la professoressa Maria Antonietta Belisario. In particolare, a lei voglio fare i più sinceri ringraziamenti, perché ha creduto in me, e da ottimo professore universitario, ha capito il mio carattere trovando il modo di comunicare i giusti insegnamenti per poter affrontare e superare questi quattro anni di dottorato.

Infine, devo assolutamente dire grazie alla persona più importante della mia vita, mio marito, che conosco da circa vent'anni, e ha vissuto tutti i traguardi professionali da me raggiunti, sostenendomi nella buona e cattiva sorte. Grazie ai mie genitori, che come sempre, anche in questo momento mi hanno sostenuto.