

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

Scuola di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in

ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**EFFETTO DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI
AD ALTA FREQUENZA SULL'ESPRESSIONE
GENICA E PROTEICA DELL'ENZIMA
ACETILCOLINESTERASI IN CELLULE PC12**

Tesi di Laurea in
Fisiologia applicata all'Ambiente

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Correlatore

D.ssa Paola Valbonesi

Presentata da

Samanta Sansovini

III sessione

Anno accademico 2011-2012

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	6
1.1 I CAMPI ELETTROMAGNETICI.....	7
1.1.1 Il campo elettrico.....	8
1.1.2 La corrente elettrica.....	10
1.1.3 Il campo magnetico.....	11
1.1.4 Il campo elettromagnetico.....	13
1.1.5 Applicazioni campi HF-EMF.....	16
1.2 INTERAZIONE DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI CON LA MATERIA VIVENTE.....	19
1.2.1 Caratterizzazione elettrica dei tessuti biologici.....	20
1.2.2 Meccanismi d'interazione con campi elettromagnetici ad alta frequenza.....	22
<i>Dosimetria.....</i>	<i>25</i>
1.2.3 Effetti dei campi elettromagnetici in ambito sanitario.....	26
1.2.4 Effetti termici e non termici dei campi elettromagnetici ad alta frequenza.....	27
<i>a) Effetti termici.....</i>	<i>28</i>
<i>b) Effetti non termici.....</i>	<i>29</i>
1.2.5 Studi in vivo.....	31
<i>a) Studi sul sistema nervoso umano.....</i>	<i>32</i>
<i>b) Studi su animali.....</i>	<i>33</i>
1.2.6 Studi in vitro.....	34
<i>a) Studi di genotossicità.....</i>	<i>34</i>
<i>b) Effetti non genotossici cancro-rilevanti.....</i>	<i>35</i>
<i>c) Effetti sull'espressione genica e proteica.....</i>	<i>36</i>
1.2.7 Studi epidemiologici.....	36
1.2.8 Effetti dei campi elettromagnetici sull'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi.....	38
2. LEGISLAZIONE.....	40
2.1 QUADRO DI RIFERIMENTO NORMATIVO.....	40
2.2 NORMATIVA EUROPEA.....	41
2.3 NORMATIVA NAZIONALE.....	43
2.4 NORMATIVA REGIONE EMILIA ROMAGNA.....	46
3. SISTEMI BIOLOGICI DI STUDIO.....	48
3.1 SISTEMA COLINERGICO.....	48
3.2 STRUTTURA MOLECOLARE E MECCANISMO DI FUNZIONAMENTO DELL'ACHÉ.....	53
3.2.1 Polimorfismo dell'ACHÉ.....	56
3.2.2 Ruoli non colinergici dell'ACHÉ.....	58
3.2.3 Risposta allo stress dell'ACHÉ.....	59
3.3 LINEA CELLULARE PC12.....	60

4. SCOPO DELLA TESI.....	62
5. MATERIALI E METODI SPERIMENTALI.....	64
5.1 COLTURE CELLULARI.....	64
<i>Semina delle cellule per esperimenti.....</i>	<i>65</i>
5.2 SISTEMA D'IRRAGGIAMENTO.....	66
<i>Modalità d'irraggiamento.....</i>	<i>68</i>
5.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA.....	70
5.3.1 Estrazione delle proteine.....	70
5.3.2 Quantificazione proteica.....	70
5.3.3 Saggio enzimatico.....	72
<i>Cinetica enzimatica.....</i>	<i>73</i>
5.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA.....	75
5.4.1 Estrazione dell'RNA totale.....	75
<i>Procedimento.....</i>	<i>75</i>
5.4.2 Trascrizione inversa.....	77
<i>Procedimento.....</i>	<i>78</i>
5.4.3 Reazione a catena della DNA-polimerasi.....	78
5.4.4 PCR real-time.....	81
<i>a) Messa a punto del metodo.....</i>	<i>86</i>
<i>b) Procedimento di analisi.....</i>	<i>88</i>
5.5 TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI.....	89
6. RISULTATI.....	90
6.1 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA DELL' AChE.....	90
6.1.1 Valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP.....	90
6.1.2 Valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito a esposizione a EMF ad alta frequenza.....	92
6.1.3 Valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito a stress termico.....	93
6.2 VALUTAZIONE DELLA CINETICA ENZIMATICA DELL' AChE.....	94
6.2.1 Valutazione della cinetica enzimatica dell'AChE in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP.....	94
6.2.2 Valutazione della cinetica enzimatica dell'AChE in seguito a esposizione a EMF ad alta frequenza.....	95
6.2.3 Valutazione della cinetica enzimatica dell'AChE in seguito a stress termico.....	96
6.2.4 Valutazione dei parametri costituenti la cinetica enzimatica.....	97
6.3 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL' AChE.....	98

6.3.1	Risultati della messa a punto del metodo di analisi mediante PCR real-time.....	98
	<i>a)Scelta dei geni housekeeping adatti al nostro sistema sperimentale.....</i>	<i>98</i>
	<i>b)Preparazione delle curve standard e valutazione delle efficienze di reazione.....</i>	<i>100</i>
6.3.2	Valutazione dell'espressione genica dell'AChE in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP.....	101
6.3.3	Valutazione dell'espressione genica dell'AChE in seguito a esposizione a EMF ad alta frequenza.....	102
6.3.4	Valutazione dell'espressione genica dell'AChE in seguito a stress termico.....	103
7.	DISCUSSIONE.....	104
8.	CONCLUSIONI.....	110
	Bibliografia.....	112

1. INTRODUZIONE

Il rapido sviluppo di tecnologie che generano campi elettromagnetici ha generato numerose preoccupazioni per i loro possibili effetti sulla salute.

Queste preoccupazioni sono fondate su risultati di numerosi studi che hanno suggerito la possibilità di effetti a lungo termine, come sviluppo di tumori e malattie degenerative, a seguito di esposizioni croniche a livelli anche molto bassi. In realtà questi sospetti in alcuni casi sono stati ingigantiti da informazione non scientifica, spesso parziale o distorta, che ha creato nei cittadini una percezione dei rischi dei campi elettromagnetici molto diversa dalle stime oggettive degli esperti in materia.

In questo modo si sono privilegiati risultati di un certo tipo rispetto ad altri, falsando quel “bilancio delle evidenze” attorno al quale si crea il prospetto scientifico. Inoltre si sono esasperate e fraintese le normali e positive discussioni tra ricercatori, creando la falsa impressione di una comunità scientifica completamente divisa in due fazioni, di pari consistenza e pari solidità di argomenti.

Queste circostanze hanno creato ansie, polemiche e un’aperta opposizione da parte dei cittadini nei confronti di molte sorgenti di campi elettromagnetici, ma anche una crescente sfiducia nelle autorità, negli enti di prevenzione e protezione della salute. E’ importante quindi, avere un quadro globale dei risultati delle ricerche per avere una panoramica dei possibili effetti reali correlati alla presenza di campi elettromagnetici nell’ambiente (Istituto Superiore di Sanità, ISS).

1.1 I CAMPI ELETTROMAGNETICI

Ovunque nell'ambiente possono essere presenti campi elettromagnetici (EMF), sia prodotti da sorgenti naturali che antropiche. Le prime sono rappresentate da un accumulo locale di cariche elettriche in occasione di temporali e dal campo magnetico terrestre, il quale permette all'ago della bussola di orientarsi lungo la direzione nord-sud e viene utilizzato da uccelli e pesci nella navigazione. Il *fondo elettromagnetico* naturale, limitatamente alle radiazioni non ionizzanti, si estende in un campo di frequenza che va all'incirca dai mHz fino alle centinaia di Ghz. Le sorgenti del fondo elettromagnetico naturale (suddivise secondo il campo di frequenza) sono state elencate in tabella:

DENOMINAZIONE INTERNAZIONALE	CAMPO DI FREQUENZE	SORGENTI NATURALI	AMBIENTE
ULF	1 mHz - 3 Hz	modi risonanti della cavità magnetosferica, dovuti a interazione tra vento solare e magnetosfera	interno cavità magnetosferica
ELF	3 Hz - 3 kHz	modi risonanti della cavità ionosferica, scariche atmosferiche (sferiche)	interno della cavità ionosferica
VLF	(3 - 30) kHz	scariche atmosferiche	interno della cavità ionosferica
LF	(30 - 300) kHz	scariche atmosferiche	interno della cavità ionosferica
MF	300 kHz - 3000 MHz	scariche atmosferiche	interno della cavità ionosferica
HF	(3 - 30) MHz	scariche atmosferiche	atmosferico planetario
VHF	(30 - 300) MHz	scariche atmosferiche e cosmico (solare-galattico)	atmosferico planetario (propagazione rettilinea)
UHF	300 MHz - 3 GHz	cosmico (solare-galattico)	planetario (propagazione rettilinea)
SHF	(3 - 30) GHz	cosmico (solare-galattico)	planetario (propagazione rettilinea)
EHF	(30 - 300) GHz	cosmico (solare-galattico)	planetario (propagazione rettilinea)

Tabella 1.1_ Sorgenti del fondo *elettromagnetico naturale* (Istituto Nazionale di Geofisica e Vulcanologia, INGV).

Gli EMF generati da sorgenti artificiali sono largamente utilizzati dalla società contemporanea nel settore sanitario, tramite raggi x e nell'elettricità fornita da qualsiasi presa di corrente, la quale implica emissione di EMF a bassa frequenza. Di fondamentale importanza risultano le antenne televisive, gli impianti radiofonici o le stazioni radio base per telefonia mobile, quali utilizzano diversi tipi di radioonde ad alta frequenza per la trasmissione di informazioni (Elettra 2000).

Il *fondo elettromagnetico artificiale*, che ha una frequenza variabile tra qualche Hz fino a centinaia di GHz, viene prodotto dalle varie applicazioni tecnologiche di cui si serve la società moderna (elettrodi, cabine di trasformazione, impianti industriali e di telecomunicazione ed in generale dispositivi elettrici ed elettronici di comune utilizzo). Il fondo elettromagnetico di origine antropica contribuisce in maniera rilevante alla costituzione del fondo elettromagnetico terrestre. Nelle aree urbane e industriali dove viene generato, il fondo antropico è particolarmente intenso, ma anche nelle aree rurali, e più distanti dalle aree industrializzate questo fondo non è completamente assente. L'escursione in frequenza del rumore di origine antropica è schematizzata in tabella:

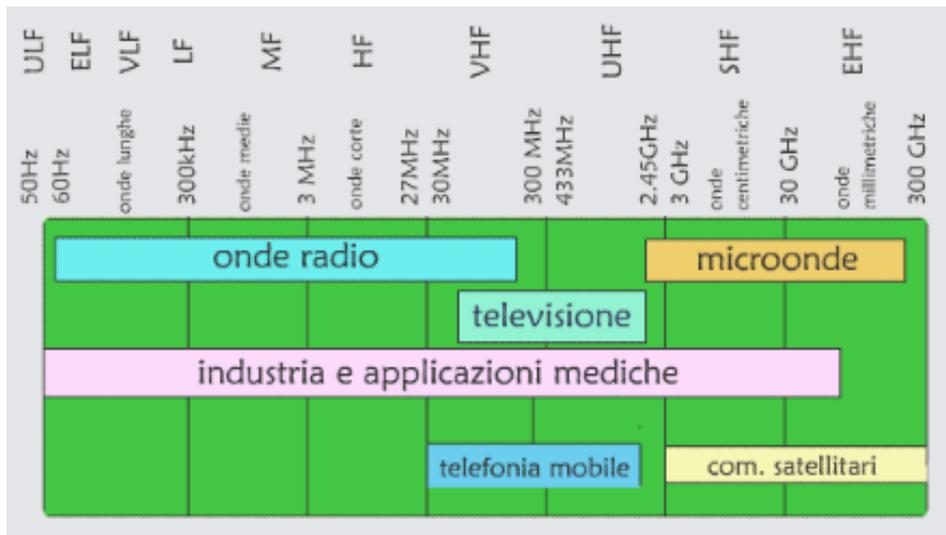


Tabella 1.2_ Sorgenti di fondo *elettromagnetico artificiale* (INGV).

Le onde elettromagnetiche si propagano attraverso un trasferimento di energia elettromagnetica da un luogo ad un altro, questo fenomeno può avvenire nello spazio libero (via etere), oppure può essere agevolato, confinandolo utilizzando appropriate linee di trasmissione (guide d'onda, cavi coassiali, ecc.). Secondo la *teoria di Maxwell*, le onde elettromagnetiche sono fenomeni oscillatori, solitamente di tipo sinusoidale e sono costituite normalmente da due grandezze che variano periodicamente nel tempo: il *campo elettrico* ed il *campo magnetico*.

1.1.1 Il campo elettrico

Il *campo elettrico* (E) viene definito come una proprietà o una perturbazione dello spazio, prodotta dalla presenza di cariche elettriche, positive o negative (ARPA). Le cariche elettriche si misurano in *Coulomb*, quelle di segno uguale si respingono e quelle di segno opposto si attraggono. Questo fenomeno può essere descritto da un sistema composto da cariche elettriche tra le quali viene esercitata una forza, come illustrato in figura 1.3.

Consideriamo due corpi piccolissimi (oggetti puntiformi), separati dalla distanza r e dotati di cariche q e Q . Su ognuno dei due corpi agisce una forza, diretta secondo la congiungente i due punti e con un'intensità data dalla *legge di Coulomb*, nella quale ϵ_0 è la *costante dielettrica del vuoto* ($8.854 \cdot 10^{-12}$ F/m) e $\pi = 3,1415$. Ne deriva che la forza è tanto più intensa quanto più elevato è il valore di q e Q , e diminuisce con la loro distanza (inversamente proporzionale a r^2).

(Legge di Coulomb)

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{qQ}{r^2}$$

La forza totale che agisce su ogni carica, nel caso in cui si abbia un sistema costituito da un insieme di particelle cariche, è la somma delle forze esercitate da tutte le altre, ciascuna delle quali contribuisce con un termine “ F ” dalla *legge di Coulomb* .

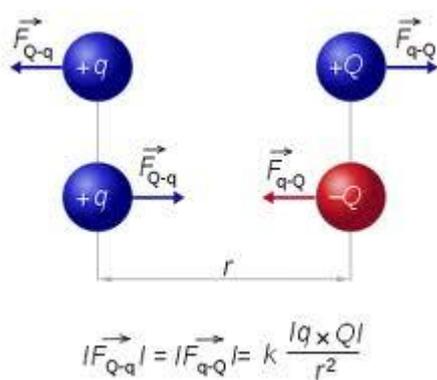


Figura 1.3_ Forza fra due cariche puntiformi q e Q , separate da una distanza r , quelle sopra di segno uguale e quelle sotto di segno opposto.

Il sistema può essere immaginato come uno spazio modificato dalla presenza di ogni singola carica, in modo tale che quando un'altra carica viene a trovarsi in questa regione essa subisce l'azione di una forza, non deve essere quindi pensato come un'azione a distanza fra le diverse cariche elettriche. Si dice quindi che il campo è divenuto sede di un campo di forze, questo implica che se una carica q viene posta in tale zona di spazio, essa è soggetta ad una forza. E' possibile quindi svincolare il valore q della carica su cui la forza si manifesta, introducendo il *campo elettrico* (*forza su unità di carica*). Se indichiamo con F la forza esercitata sulla carica q , E può essere definito dalla seguente formula:

$$\mathbf{E} = \frac{\mathbf{F}}{q}$$

Per la descrizione completa del campo di forze è sufficiente la specificazione del valore di E in ogni punto della regione di interesse. L'unità di misura del *campo elettrico* è Newton su *Coulomb* (N/C), anche se è più comune misurare E in Volt su Metro (V/m) (D. Andreuccetti et al. 2001).

1.1.2 La corrente elettrica

La corrente elettrica è costituita da un flusso ordinato di cariche elettriche che scorre per convezione nel verso in cui si muovono le cariche positive; nel caso di cariche negative quindi, il verso è opposto al moto delle cariche. L'intensità di corrente è data dalla carica che attraversa una superficie nell'unità di tempo:

$$i = \frac{\Delta q}{\Delta t}$$

Dove q è la quantità di carica che attraversa la data superficie nel tempo t e la corrente i si misura in *Ampere* (A). Il fluire delle cariche, e quindi della corrente elettrica, può avvenire sia nel vuoto, sia nei corpi materiali. Risultano di interesse particolare la *conduzione metallica* e la *conduzione delle soluzioni*. Se diciamo ad esempio che attraverso una certa superficie scorre una corrente di un *Ampere*, significa che attraverso la superficie fluisce un *Coulomb* di carica ogni secondo.

In condizioni generali, per i conduttori, esiste una relazione di proporzionalità fra la *differenza di potenziale (d.d.p.)* (V), o tensione, applicata fra i due estremi di un conduttore, e i che scorre fra questi due punti. Questa relazione costituisce la *legge di Ohm*:

$$V = R i$$

Dove la quantità R è detta la *resistenza* di quel conduttore e dipende dalla forma geometrica e dalla natura fisica del conduttore, tale grandezza viene misurata in *ohm* (Ω). In elettrotecnica viene utilizzata anche la grandezza inversa della resistenza ($1/R$) alla quale si dà il nome di *conduttanza* e la cui unità di misura è il *Siemens* (S).

Quando la corrente elettrica attraversa un materiale conduttore si ha un'interazione tra cariche e materiale, con conseguente conversione dell'energia elettrica in calore. Questa trasformazione si basa su un meccanismo denominato *effetto joule*, e viene determinata dal campo elettrico che fa scorrere la corrente e trasferisce potenza alle cariche in movimento, e queste a loro volta la cedono al materiale a seguito delle collisioni con gli atomi del reticolo (conduttore solido) o con le molecole del solvente (soluzioni ioniche) che, aumentano l'intensità dei moti microscopici disordinati, producendo in fine un aumento di energia termica del sistema.

La *potenza* (P) può essere calcolata in funzione della *tensione applicata* V e i che scorre nel conduttore. La *potenza* esprime la quantità di energia trasferita nell'unità di tempo secondo la seguente formula:

$$P = V i$$

La *potenza* si misura in *watt* (W), mentre l'energia si misura in *joule* (J), quindi se una certa sorgente fornisce potenza al ritmo costante P per un tempo t (s), l'energia totale erogata risulta:

$$E = P t$$

1.1.3 Il campo magnetico

Come spiegato in precedenza, le cariche elettriche producono un campo elettrico nello spazio circostante. Nel momento in cui le cariche presenti si mettono in movimento, e quindi si crea corrente, esse danno origine anche ad un *campo magnetico* (H). Le cariche elettriche sono dunque le sorgenti sia del campo elettrico che del campo magnetico, ed è possibile affermare che le cariche elettriche immobili danno origine al solo campo elettrico, mentre le cariche in movimento creano anche un *campo magnetico*.

Il campo elettrico e il campo magnetico sono rapidamente variabili nel tempo e l'esistenza di uno dei due implica necessariamente la presenza dell'altro. Se tuttavia consideriamo che siano l'uno indipendente dall'altro, possiamo trattare due differenti casi. Nel caso di cariche negative e positive fra loro ben separate ed immobili il campo magnetico non esiste, mentre il campo elettrico è tanto più intenso quanto più le cariche positive e negative sono fra loro separate nello spazio, poiché in questo modo si cancella l'effetto di mutuo annullamento dei campi provenienti da cariche di segno opposto. Mentre se si è in presenza di un conduttore percorso da corrente, il campo esistente è praticamente solo quello magnetico. Questo è dato dalla presenza nel conduttore, di cariche positive e negative in ugual numero su scala microscopica, rendendo questo sia localmente che globalmente neutro, mentre il campo elettrico all'esterno è praticamente nullo.

Al contrario, le linee di E , hanno origine dalle cariche positive e terminano su quelle negative. Le linee di H circondano le correnti e si sviluppano in percorsi chiusi senza inizio né fine, come rappresentato in figura 1.4 (D. Andreuccetti et al.2001).

H può essere definito come una proprietà o perturbazione dello spazio prodotta dal movimento di cariche elettriche o per mezzo di magneti (calamite). Questo fenomeno si può verificare constatando che ponendo un corpo magnetizzato nella regione perturbata questo risulta soggetto ad una forza.

L'effetto del *campo magnetico* è diverso a seconda del materiale che si desidera magnetizzare. Un campo magnetico è tanto più intenso quanto più elevato il *vettore induzione magnetica* (\vec{B}), la cui intensità nel sistema S.I. si misura in *Tesla* [T]; 1 *T* è un campo \vec{B} tale che una carica di 1C in moto con velocità (v) di 1 m/s, è soggetta ad una forza di 1 N, questo se \vec{v} è perpendicolare a \vec{B} .

Il campo magnetico nel S.I. si misura invece in *Ampere al metro* [A/m] ed è legato all'induzione magnetica \vec{B} dall'equazione:

$$\vec{B} = \mu \vec{H}$$

Dove μ è la permeabilità magnetica del mezzo, da questo si deduce che i vari materiali anche se sottoposti allo stesso campo magnetico \vec{H} , generano un'induzione con valore diverso.

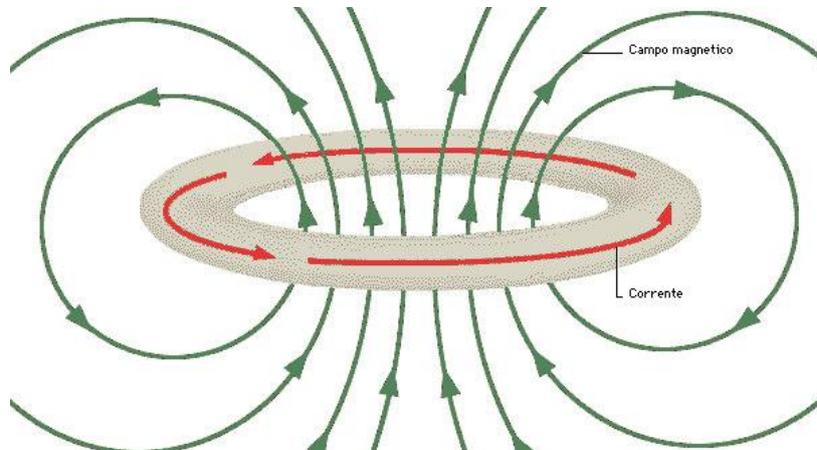


Figura 1.4_Campo elettromagnetico.

Per poter paragonare i vari materiali tra di loro è possibile poter disporre di un coefficiente μ di confronto, il cui valore è dato dall'equazione:

$$\mu = \mu_0 \mu_r$$

Dove μ_0 è la permeabilità magnetica del vuoto, $4 \cdot \pi \cdot 10^{-7} \cong 1,25664 \cdot 10^{-6} \frac{\text{H}}{\text{m}}$, e μ_r indica la permeabilità magnetica relativa del materiale.

1.1.4 Il campo elettromagnetico

Il campo elettrico e il campo magnetico si comportano come dei veri e propri enti fisici oltre ad essere dei comodi strumenti per descrivere l'interazione tra cariche e correnti elettriche. Questo è confermato dal fatto che quando il campo elettrico e il campo magnetico variano nel tempo, nascono importanti fenomeni di interazione fra essi che non sono presenti nel caso dei campi statici.

Un campo elettrico variabile nel tempo modifica la distribuzione spaziale di un campo magnetico e analogamente, un campo magnetico modifica la distribuzione spaziale di un campo elettrico.

La descrizione delle *oscillazioni periodiche* è essenziale per spiegare fenomeni derivanti da *campi elettromagnetici*. Per *oscillazioni periodiche* si intende quando le grandezze che oscillano nel tempo, in questo caso il campo elettrico e il campo magnetico, si ripetono identiche dopo un certo intervallo di tempo T , detto *periodo*.

La *frequenza* (f) è un parametro di notevole importanza per la caratterizzazione delle oscillazioni, che in questo caso indica la rapidità con cui i campi oscillano nel tempo, ed è pari all'inverso del *periodo*:

$$f = \frac{1}{T}$$

f si misura in hertz (Hz), dove 1 Hz corrisponde ad una oscillazione al secondo. Spesso vengono utilizzati multipli dell'Hz come il *kilohertz* (kHz), il *megahertz* (MHz) e il *gigahertz* (GHz).

Con l'aumentare della frequenza il campo elettrico e il campo magnetico interagiscono sempre più intensamente tra di loro, tanto che possono essere considerati come un unico ente fisico, il ***campo elettromagnetico***.

Come conseguenza della variabilità dei campi nel tempo si presenta un importante fenomeno, dovuto al fatto che il *campo elettromagnetico* non rimane immobile nello spazio, ma si propaga sotto forma di *onde elettromagnetiche*, allontanandosi lungo *la direzione di propagazione* della sorgente da cui si origina (figura 1.5).

In un'*onda elettromagnetica*, il campo elettrico e il campo magnetico presentano dei picchi di intensità che si succedono nello spazio, con una successione che si allontana dalla sorgente. La distanza tra due picchi successivi, prende il nome di *lunghezza d'onda* (λ) ed è in relazione con la *frequenza* per mezzo della seguente relazione:

$$\lambda = \frac{c}{f}$$

Dove c è la velocità della luce e vale 299.792,458 km/s (generalmente si approssima a 300.000 km/s). La relazione in questione è di importanza fondamentale in quanto stabilisce la proporzionalità inversa tra *frequenza* e *lunghezza d'onda* di una radiazione elettromagnetica, quindi al decrescere della frequenza aumenta la rispettiva lunghezza d'onda.

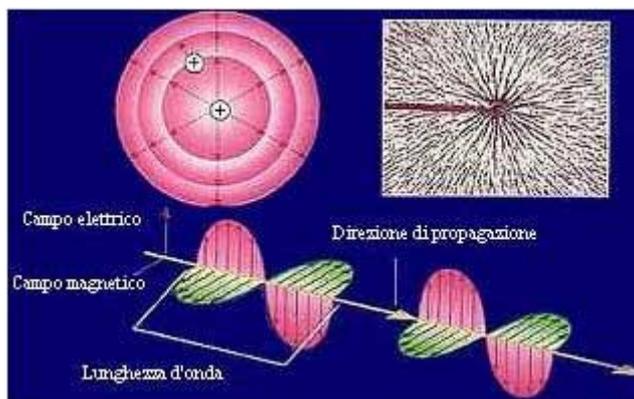


Figura 1.5_Rappresentazione di un'onda elettromagnetica.

Un'importante caratteristica della propagazione delle *onde elettromagnetiche* è la loro capacità di trasportare energia, la quale è proporzionale al prodotto dell'intensità di E e H . L'energia associata alla radiazione elettromagnetica è direttamente proporzionale alla frequenza dell'onda stessa attraverso la relazione:

$$E = h \cdot f$$

dove h è una costante detta *Costante di Planck* pari a $6.626 \cdot 10^{-34}$ J·s.

L'energia elettromagnetica trasportata dall'onda nell'unità di tempo per unità di superficie si definisce *densità di potenza* (S) e si esprime in Watt su metro quadro [W/m^2]. Maggiore è la frequenza, maggiore è l'energia trasportata dall'onda. Quando un'onda elettromagnetica incontra un ostacolo penetra nella materia e deposita la propria energia producendo una serie di effetti diversi a seconda della sua frequenza. I rischi potenziali per la salute umana sono strettamente connessi ai meccanismi di interazione delle radiazioni con la materia (ARPA). Gli effetti dei campi elettromagnetici sul corpo umano dipendono sia dalla loro intensità, sia dalla loro frequenza, questi inducono nel corpo umano delle correnti elettriche che, se di intensità sufficiente, possono produrre vari effetti come riscaldamento e scosse elettriche, secondo la loro ampiezza e la loro frequenza. Per produrre effetti di questo genere è necessario che i campi esterni al corpo siano molto intensi, notevolmente al di sopra di quelli presenti nei normali ambienti (Elettra 2000).

L'insieme di tutte le possibili onde elettromagnetiche, in funzione della frequenza e della lunghezza d'onda, costituisce lo *spettro elettromagnetico*. Sulla base di questi parametri viene comunemente fatta una suddivisione delle varie categorie di onde. In base a frequenza o lunghezza d'onda, lo spettro varia da onde a frequenze molto basse, come quelle utilizzate negli elettrodomesti o nella telefonia fissa, a quelle a frequenza più elevate come le radiofrequenze, microonde infrarosso, visibile e ultravioletto, per poi concludersi con le radiazioni a frequenza altissima come i raggi x e gamma (figura 1.6).

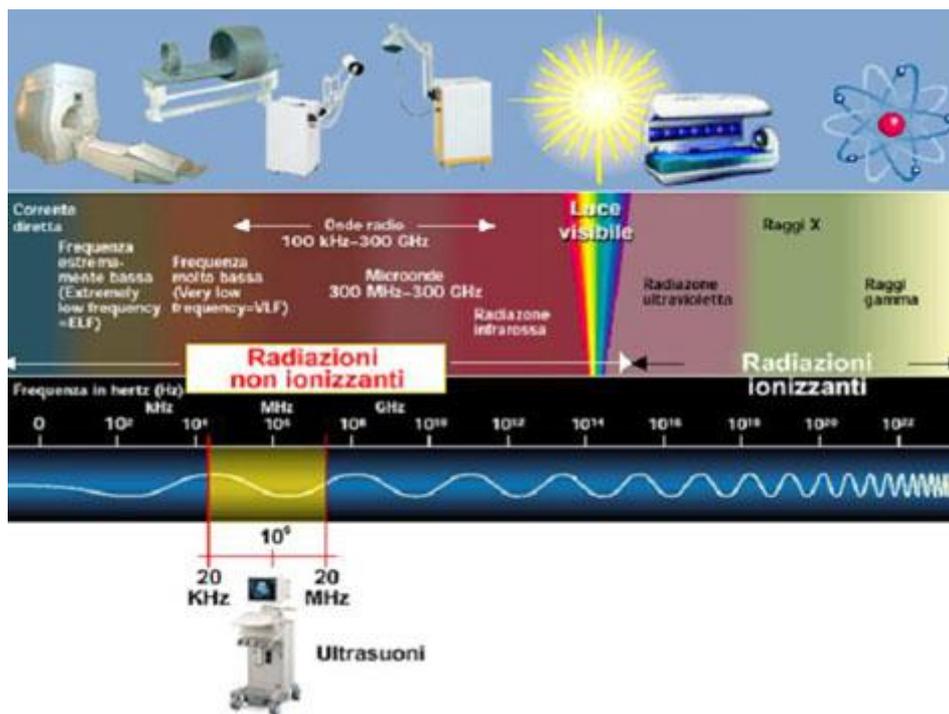


Figura 1.6 Spettro elettromagnetico.

Esiste un'ulteriore suddivisione dello spettro elettromagnetico in due grandi famiglie, di notevole importanza in tema di effetti biologici e sanitari. Le *radiazioni ionizzanti* (IR) sono onde elettromagnetiche con frequenza superiore a 3000 THz e lunghezza d'onda inferiore a 100 nm, e presentano un'energia (> 12.4 eV) tale da rompere i legami chimici che tengono uniti gli atomi e le molecole, sono quindi in grado di ionizzare la materia. Le *radiazioni non ionizzanti* (NIR) sono onde che con la loro frequenza inferiore non trasportano un quantitativo di energia sufficiente a determinare la rottura dei legami chimici e a produrre ionizzazione. Il presente lavoro di tesi si baserà sullo studio di quest'ultima tipologia di radiazioni.

Le radiazioni non ionizzanti di maggiore interesse ambientale sono (ARPA):

- radiazione con frequenza compresa tra 0 a 300 GHz, che possono a loro volta venire suddivise in:
 - *campi elettromagnetici a frequenze estremamente basse* (ELF), con frequenza tra 0 e 300 Hz, anche detti semplicemente campi elettromagnetici a bassa frequenza, prodotti da sistemi che ci forniscono elettricità e tutti gli apparecchi che la usano;
 - *campi elettromagnetici a frequenza intermedia* (IF) con frequenza tra 300 Hz e 100 KHz, emessi da schermi dei computer, dispositivi anti-taccheggio e i sistemi di sicurezza;
 - *campi elettromagnetici a radiofrequenze e microonde* (RF e MO), che convenzionalmente vanno **da frequenze di 100 KHz a frequenze di 300 GHz**, anche comunemente detti campi *elettromagnetici ad alta frequenza* (HF-EMF), prodotti da radio, televisione, radar, antenne per la telefonia cellulare e forni microonde;
- *radiazione luminosa* (luce visibile);
- *radiazione ultravioletta*.

1.1.5 Applicazione campi HF-EMF

I campi elettromagnetici costituiscono la base dei sistemi di telecomunicazione e di diffusione televisiva in tutto il mondo, vengono quindi utilizzati per trasmettere informazioni su lunghe distanze (Elettra 2000).

Le principali sorgenti artificiali nell'ambiente di campi HF-EMF sono gli impianti per la radio telecomunicazione. Queste strutture raggruppano diverse tipologie di apparati tecnologici tra i quali:

- Impianti per la telefonia mobile o cellulare, o stazioni radio base (SRB);
- Impianti di diffusione radiotelevisiva (RTV: radio e televisioni);
- Ponti radio (impianti di collegamento per telefonia fissa e mobile e radiotelevisivi);
- Radar.

In generale un impianto di radio-telecomunicazione (figura 1.7), sia esso televisivo, per telefonia mobile, radar o ponte radio, è dato dall'insieme delle apparecchiature che consentono la diffusione o il trasferimento di segnali attraverso onde elettromagnetiche ad una certa frequenza o *range* di frequenza e con una determinata potenza.

Tali apparecchiature sono di norma costituite da un apparato ricevente (*ricevitore*), da un apparato trasmittente (*trasmettitore*), dal sistema radiante (*trasduttore*), composto da elementi radianti (*antenne trasmettenti*) e dai sistema di collegamento tra le varie antenne e di alimentazione dal trasmettitore.

In sostanza, per svolgere la loro funzione, gli impianti per radio-telecomunicazione devono emettere verso l'esterno, con la massima efficienza, l'energia elettromagnetica generata e amplificata dal trasmettitore; questa emissione avviene attraverso apparati trasduttori composti da dispositivi (*antenne*) che operano la trasformazione di un segnale elettrico in energia elettromagnetica irradiata nello spazio libero.

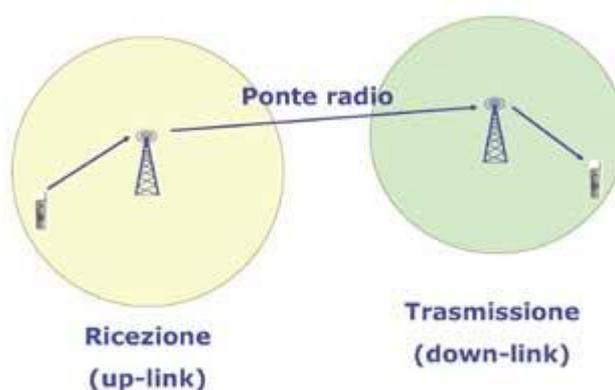


Figura 1.7_Schema semplificato di un impianto di radio-telecomunicazione.

Una delle caratteristiche principali degli impianti per radiotelecomunicazione, da cui dipende l'entità dei campi elettromagnetici generati, è infatti la *potenza in ingresso al connettore* d'antenna del sistema radiante, che si misura in Watt e relativi multipli e sottomultipli (di norma dai milliwatt [mW] ai chilowatt [kW]).

Un'altra proprietà importante di tali apparati è il *guadagno* (espresso in dBi o dBm), che misura la capacità del sistema di concentrare la potenza elettromagnetica emessa in una determinata direzione. Il *guadagno* si esprime per confronto tra l'antenna considerata e un'antenna di riferimento, generalmente un'antenna *isotropa* (cioè che irradia in modo uguale in tutte le direzioni), ed in tal caso si esprime in dBi (*decibel isotropic*), oppure un *dipolo a mezz'onda*, in tal caso il guadagno si esprime in dBm (*decibel milliwatt*). Di norma il guadagno si misura nella direzione di massimo irraggiamento.

L'entità della *potenza massima irradiata* (ERP) dipende dalla potenza in ingresso al connettore d'antenna al netto delle perdite (es. cavo di alimentazione) e dal guadagno.

La trasmissione può essere di tipo *broadcasting*, oppure di tipo *direttivo*; nel primo caso l'antenna deve diffondere il segnale su aree abbastanza vaste per raggiungere il maggior numero di utenti possibile, mentre nel secondo le antenne costituiscono un ponte radio, cioè un collegamento tra due punti posti in visibilità ottica tra di loro. Sono un esempio di impianti *broadcasting* i sistemi di diffusione radiotelevisiva e le SRB che sostanzialmente differiscono per le potenze impiegate e quindi per le aree di territorio coperte: i primi hanno spesso potenze superiori al kW e a seconda della loro quota di installazione, coprono bacini di utenza che interessano anche più province, mentre le SRB impiegano potenze di decine di Watt e di solito interessano aree di qualche chilometro.

Attualmente nel panorama delle radiotelecomunicazioni si sta assistendo ad una forte evoluzione tecnologica dei sistemi di diffusione dei segnali, con lo sviluppo di tecniche di trasmissione sempre più avanzate, di tipo digitale, che permettono un'offerta sempre più ampia e diversificata di servizi (multimediali e interattivi) agli utenti, dovendo trasmettere una grande mole di informazioni tra loro eterogenee e garantire al tempo stesso un'elevata efficienza dei servizi offerti.

La rapida trasformazione, delle reti di radiotelecomunicazione ha riguardato sia le reti di telefonia mobile, con l'entrata sul mercato, del sistema **UMTS** (*Universal Mobile Telecommunications System*), sia la rete per la diffusione dei segnali radiotelevisivi, con la transizione dalla trasmissione analogica a quella digitale e quindi la comparsa dei primi sistemi di diffusione in tecnica digitale sonora **DAB** (*Digital Audio Broadcasting*) e televisiva (**DVB** (*Digital Video Broadcasting*)).

In particolare, nel settore dell'emittenza radio e televisiva, lo stesso Ministero delle Comunicazioni ha incentivato la conversione degli impianti esistenti da analogico a digitale. L'evoluzione tecnologica assume il carattere di un percorso obbligato, le cui scadenze sono fissate da provvedimenti legislativi: dal 1 gennaio 2004 ha preso ufficialmente il via in Italia la sperimentazione del servizio di televisione digitale terrestre, con la prospettiva del completamento, entro il 31 dicembre 2006, del passaggio da analogico a digitale e quindi l'abbandono delle trasmissioni in tecnica analogica.

I nuovi sistemi di diffusione in tecnica digitale dovrebbero garantire un minor impatto ambientale, dal momento che le potenze utilizzate per questo tipo di trasmissione risultano inferiori a quelle tradizionalmente usate per le trasmissioni in tecnica analogica. Un discorso parallelo riguarda l'evoluzione delle reti di telefonia mobile; l'affermazione del sistema di nuova generazione UMTS prevede l'installazione di un elevato numero di impianti, maggiore rispetto alle SRB con tecnologia GSM-DCS, e come per la televisione

digitale, potenze di trasmissione in gioco inferiori rispetto a quelle attualmente in uso. Un'ulteriore evoluzione tecnologica è rappresentata dall'avvio del sistema DVB-H che integra le reti della telefonia cellulare e del *broadcasting* televisivo. Sempre maggior importanza assumono inoltre i sistemi di tipo *Wireless* come le reti punto-multipunto per la telefonia mobile, i sistemi di connessione radio Wi-Fi (Wireless Fidelity) e Wi-Max.

1.2 INTERAZIONE DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI CON LA MATERIA VIVENTE

L'interazione dei campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con la materia ed in particolare con i tessuti biologici è un tema complesso ed interdisciplinare. I tessuti biologici in ambito elettromagnetico a differenza di altri materiali sono caratterizzati da grandezze macroscopiche quali la *conducibilità elettrica* (σ), la *permettività dielettrica* (ϵ) e la *permeabilità magnetica* (μ), le quali dipendono dalla frequenza. Grazie alla conoscenza di queste grandezze è possibile affrontare anche per i tessuti biologici problemi concernenti l'interazione e la propagazione dei campi in questo mezzo particolare, tramite l'utilizzo di modelli teorici o attraverso sperimentazione diretta. Nei meccanismi d'interazione sono di notevole importanza i fenomeni di cessione dell'energia del campo elettromagnetico al tessuto. Praticamente l'energia del campo è ceduta alle cariche elettriche (elettroni, ioni, molecole dipolari e multipolari) poste in movimento. Durante il moto le cariche collidono con le altre molecole del tessuto trasformando la loro energia meccanica in calore. Le cariche elettriche reagiscono più o meno rapidamente alle variazioni del campo a seconda della loro massa, questo dà luogo a diversi fenomeni interessanti dipendenti dalla frequenza. In generale i tessuti biologici non mostrano proprietà magnetiche e quindi non sono caratterizzati da effetti magnetici. I principali meccanismi coinvolti nell'interazione tra campi elettromagnetici e materia sono il meccanismo di *polarizzazione* e il meccanismo di *conduzione*. Il primo è innescato dalla capacità delle molecole d'acqua, essendo bipolari, di ruotare, vibrare e allinearsi sotto l'azione dei campi elettrici. In questo caso il riscaldamento del tessuto è dato dallo sfregamento molecolare dovuto al movimento delle molecole d'acqua che collidono con le molecole vicine. Gli effetti di polarizzazione dipendono in modo complesso dalla costante dielettrica locale.

Il meccanismo di *conduzione* avviene tramite la messa in moto di elettroni e ioni contenuti all'interno del tessuto e viene indotta da campi elettrici e magnetici variabili. Campi

elettrici di qualche KV/m e campi magnetici di alcune centinaia di μT possono indurre densità di correnti elettriche nei tessuti di 1 mA/m^2 , paragonabili alla densità delle correnti fisiologiche. Le correnti elettriche di conduzione sono tanto più intense quanto maggiore è la conducibilità dei tessuti (INGV).

1.2.1 Caratterizzazione elettrica dei tessuti biologici

Se considerati con un approccio macroscopico, i tessuti si comportano come mezzi viscosi e densi, a contenuto variabile di acqua, dotati di capacità di termoregolazione, nel quale sono sospesi aggregati elettricamente carichi, tipicamente ionici e molecolari. I tessuti interagiscono con il campo elettrico indotto dai campi esterni attraverso i meccanismi di *conduzione e polarizzazione* come precedentemente esposto.

Se consideriamo un punto di vista elettromagnetico, possiamo pensare ai tessuti biologici, relativamente alla frequenza considerata, come *dieletrici* in grado di immagazzinare e dissipare energia dei campi in gioco. In questo caso i tessuti possono essere trattati come un mezzo *dieletrico dispersivo e dissipativo*. Un buon conduttore riflette quasi completamente le onde elettromagnetiche e dissipa energie a causa delle correnti indotte che in esse si producono. Diversamente, un *dieletrico* è quasi completamente trasparente alle onde elettromagnetiche ma può immagazzinare una frazione di energia. I tessuti biologici, in una certa misura, sono in grado di comportarsi in entrambi i modi.

La grandezza fisica che può tener conto di questi meccanismi è la *permittività dielettrica relativa* in forma complessa:

$$\epsilon_{rel} = \epsilon_r - j\epsilon_i$$

Dove j è l'unità immaginaria, mentre r è il termine reale e tiene conto dell'accumulo temporaneo dell'energia nel mezzo. Il *fattore di perdita* (i) invece, è il responsabile della dissipazione dell'energia elettromagnetica ed è funzione della conducibilità, dato che solo in un mezzo conduttore si possono stabilire delle correnti poi eventualmente dissipate. Quindi la determinazione di questa grandezza fisica, alle frequenze interessate, caratterizza completamente l'interazione dell'onda con il tessuto biologico. Questo consente la determinazione della *costante dielettrica reale* e della *conducibilità*.

Come è possibile notare dai grafici (figura 1.8) alle basse frequenze il tessuto biologico mostra valori di ϵ_r dell'ordine di $10^6 - 10^7$. Questo significa che un campo elettrico esterno che penetra il tessuto si riduce dello stesso fattore. Per esempio un campo esterno di 10 KV/m all'interno del tessuto si abbatte fino a circa 10 mV/m. Questa caratteristica

rappresenta una difesa naturale propria di tutti gli organismi viventi provvisti di membrane cellulari, è per questo motivo che per esempio, un volatile può posarsi su una linea ad alta tensione senza riportare danni.

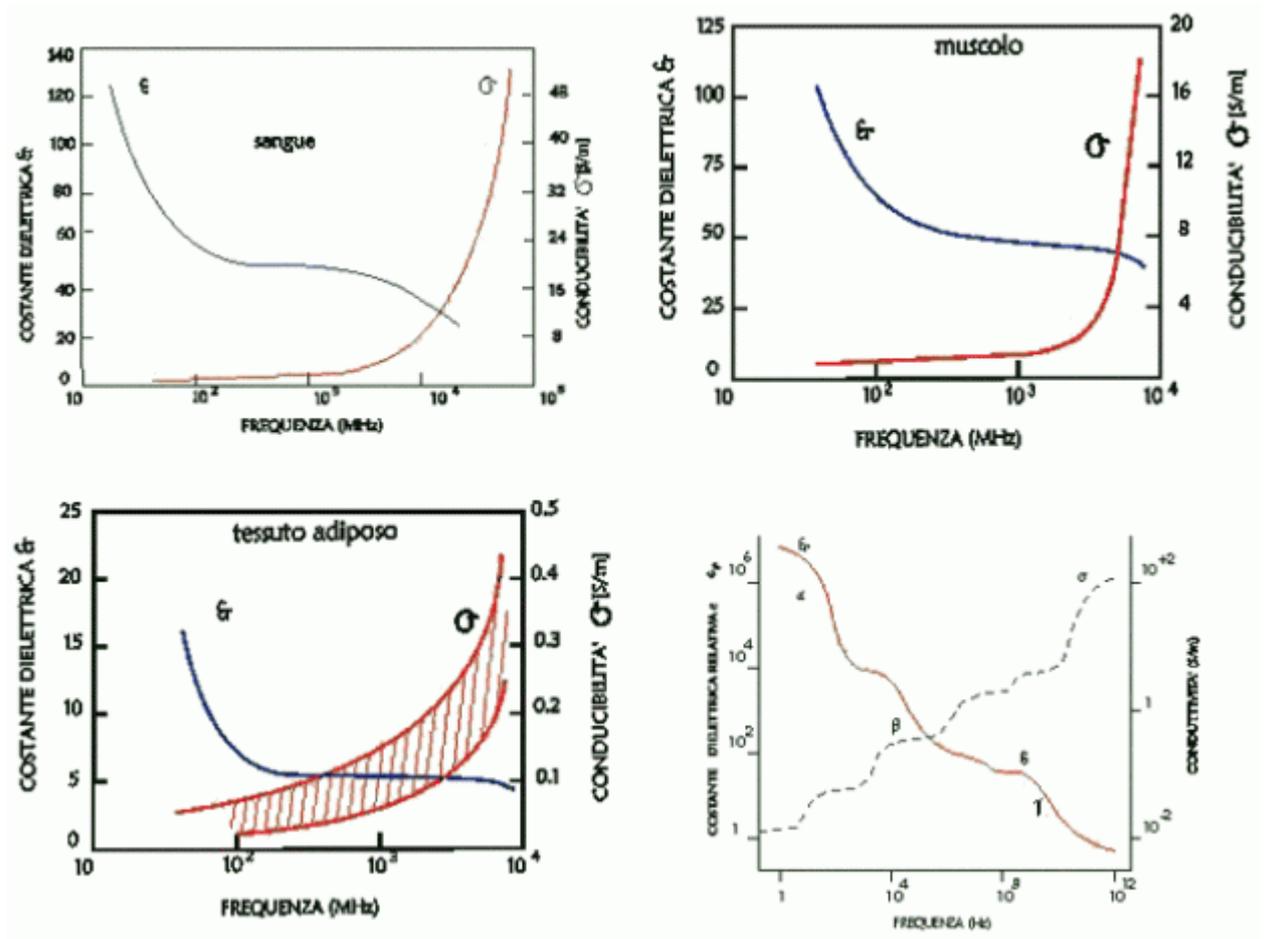


Figura 1.8 _ I primi tre grafici rappresentano i valori di ϵ' e σ in un intervallo di frequenza da 10 a 100.000 Hz in tre diversi tessuti. Nell'ultimo grafico invece sono riportati gli stessi valori per tutti i tessuti nell'intervallo di frequenze da 0 a 1 THz.

Le membrane di cellule e di altri aggregati subcellulari come i mitocondri, fanno sì che la *costante dielettrica* dell'acqua, che costituisce un'elevata percentuale dei tessuti, sia circa 80. Di conseguenza, la stessa intensità di campo, all'interno di un mezzo come l'acqua, produrrebbe un campo interno con valori almeno 10.000 volte maggiori rispetto ai campi interni ai tessuti.

Al variare della frequenza variano sia la costante dielettrica che la conducibilità e questo porta a distinguere diverse grandezze di base (grandezze dosimetriche). Si può affermare in breve, che alle **basse frequenze**, fino a 10 KHz, prevalgono alcuni meccanismi e le grandezze significative sono la *densità di corrente* e la *corrente di contatto*. Mentre alle

alte frequenze i meccanismi preponderanti sono quelli di tipo termico, le grandezze significative sono il *tasso di assorbimento specifico* (SAR) e la *densità di potenza*.

L'interazione dei campi elettrici e magnetici alle basse frequenze si deve ai campi elettrici e magnetici che generano correnti nei tessuti. Questi sono trasparenti ai campi magnetici in quanto non hanno proprietà magnetiche e le frequenze sono relativamente basse i campi elettrici e magnetici agiscono indipendentemente (INGV).

1.2.2 Meccanismi di interazione ad alta frequenza

Quando la materia subisce un'interazione con campi elettromagnetici ad alta frequenza, la parte della radiazione che si trasmette va incontro ad un'attenuazione in funzione del *fattore di perdita* ϵ_i o della *conducibilità* σ che a sua volta dipende dalla *frequenza*.

Di seguito si espone la formula che stabilisce la profondità alla quale il campo si riduce circa al 37% del suo valore:

$$\delta = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{\omega\sigma\mu}}$$

Dove δ è la *profondità di penetrazione*, ω è la *pulsazione angolare dell'onda incidente*, e μ è la *permeabilità magnetica* (figura 1.9). Da quest'ultima si evince che all'aumentare della frequenza e quindi di ω , le onde hanno sempre più difficoltà nel penetrare il mezzo. Inoltre è possibile dedurre che la lunghezza d'onda nel tessuto, al pari della velocità, si riduce pari a $\sqrt{\epsilon_r}$.

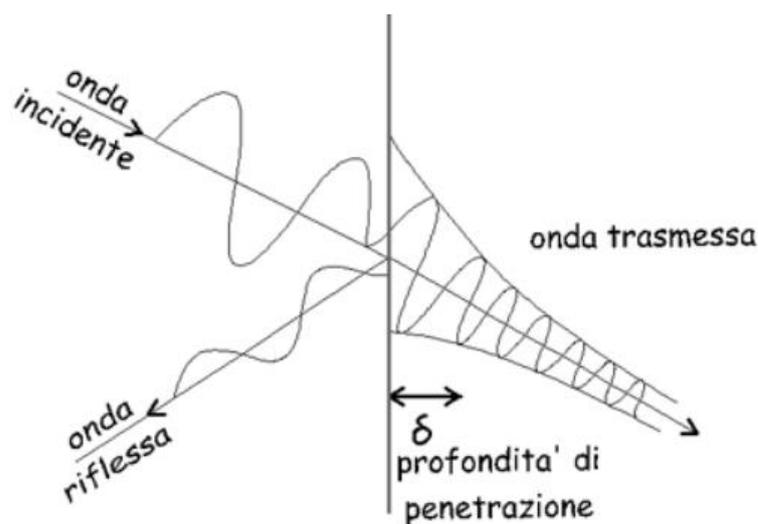


Figura 1.9_ Attenuazione di una radiazione in un mezzo.

L'esame dal punto di vista energetico dei meccanismi d'interazione dei HF-EMF risulta di notevole importanza in campo sanitario. In questo caso i meccanismi d'interazione

riguardano l'attivazione di *stati traslazionali, rotazionali e vibrazionali* (dipendenti dalla frequenza) di dipoli permanenti o di cariche spaziali (polarizzazioni/oscillazioni), con il ritorno successivo allo stato fondamentale (rilassamento) attraverso *scattering* o cessione di energia ai vari gradi di libertà possibili.

Il fenomeno di cessione energetica da parte del campo elettromagnetico ai tessuti in un intervallo che va da **100 KHz – 10 GHz** dipende da diversi fattori, come le **condizioni di risonanza** e la **polarizzazione del campo elettromagnetico** rispetto alle massime dimensioni del mezzo in esame. Come accennato in precedenza, la grandezza *dosimetrica significativa* che rappresenta tali meccanismi è rappresentata dal *tasso di assorbimento specifico*, il **SAR** (INGV). Esso descrive lo scambio energetico che avviene tra radiazione elettromagnetica e materia vivente, ovvero la quantità di energia ceduta dalla radiazione per unità di massa:

$$SAR = \frac{\sigma \cdot E_{int}^2}{\rho}$$

Dove σ è la *conducibilità elettrica del tessuto* espressa in S/m, E_{int}^2 è il *campo elettrico indotto* internamente espresso in V/m, e ρ è la *densità del tessuto* misurata in Kg/m³.

I valori del SAR dipendono dai seguenti fattori:

- Parametri che caratterizzano il campo incidente, cioè frequenza, intensità, polarizzazione e posizione relativa della sorgente e dell'oggetto (campo vicino o campo lontano);
- Caratteristiche del campo esposto, cioè dimensioni e geometria interna ed esterna, nonché proprietà dielettriche dei vari tessuti.
- Effetti di contatto a terra ed effetti di riflessione da parte di altri oggetti nel campo, vicino al corpo esposto (ICNIPR Review).

L'unità di misura del SAR è il *Watt per chilogrammo* (W/Kg). Il SAR è direttamente proporzionale alla conducibilità elettrica del tessuto o del mezzo di coltura nel caso di studi su cellule, al quadrato del campo elettrico indotto internamente, e inversamente proporzionale alla densità del tessuto (o del mezzo di coltura).

Il fenomeno della cessione energetica che sta alla base del SAR dipende anche dalle condizioni di risonanza rispetto alle massime dimensioni del mezzo in esame. Come è possibile osservare dalla figura 1.10, i valori massimi dell'assorbimento di energia si hanno nelle condizioni di risonanza. Condizione data da $\lambda_t = d$, essendo λ_t la lunghezza d'onda all'interno del tessuto e d le dimensioni del corpo. Per le frequenze oltre i 20 – 30 GHz la grandezza di base più importante diventa la *densità di potenza*.

Per frequenze via via crescenti, la profondità di penetrazione si riduce al millimetro o meno. in questo caso gli effetti sono di natura locale e riguardano essenzialmente la superficie investita (INGV).

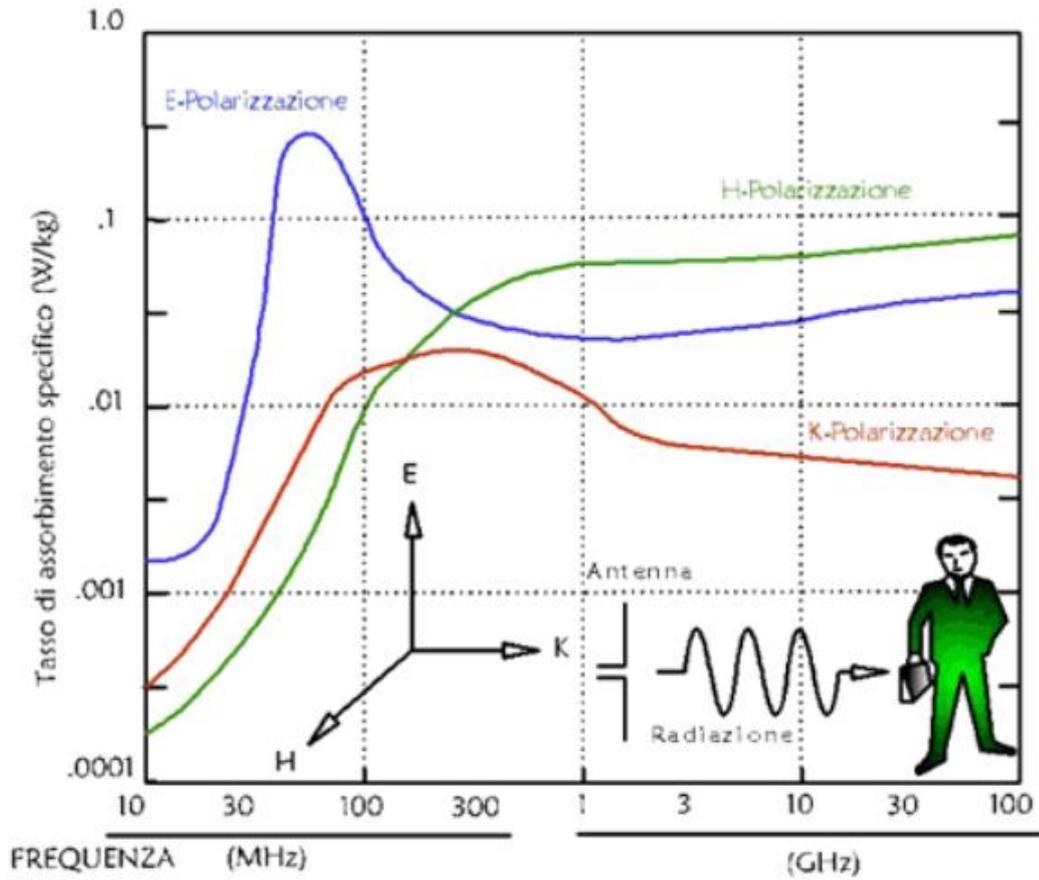


Figura 1.10 _ SAR alle varie frequenze nel caso in cui il campo elettrico sia parallelo all'uomo (E-polarizzazione), (H-polarizzazione) e con l'uomo parallelo alla direzione d'onda (K-polarizzazione).

Dosimetria

Le grandezze dosimetriche sono anche dette grandezze di base, e rappresentano valori che hanno un effettivo significato biologico e dosimetrico poiché legati ai meccanismi d'interazione biologica dei campi con l'organismo umano (1.11). I meccanismi di interazione biologica si differenziano in base alle bande di frequenza. A *basse frequenze* prevalgono *meccanismi di correnti indotte*, mentre ad **alte frequenze** è prevalente *l'assorbimento termico dell'energia del campo*. In realtà la suddivisione non è così netta poiché tali meccanismi coesistono in una significativa porzione di spettro. Inoltre bisogna considerare alcuni effetti indesiderati dovuti al contatto del corpo umano con oggetti che sono stati portati ad un elevato potenziale del campo elettrico, in alcuni intervalli di frequenza.

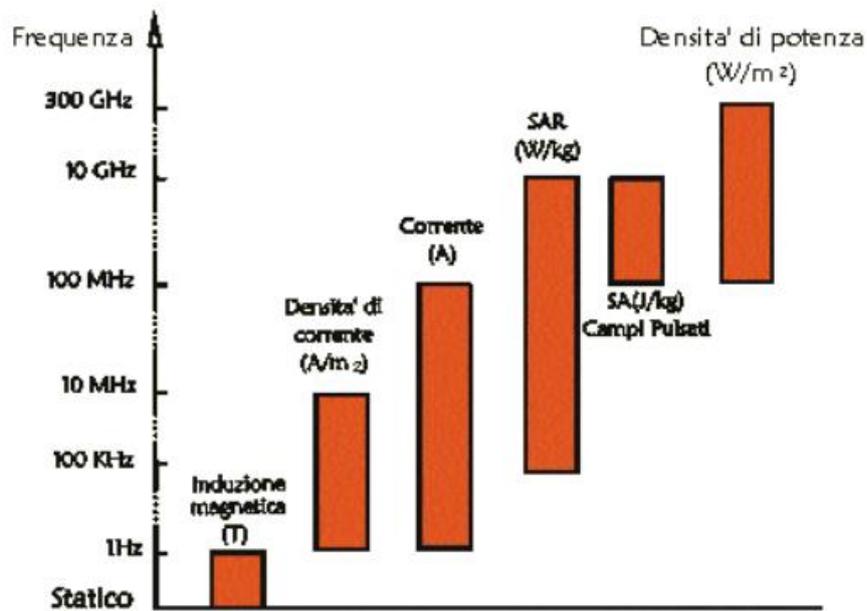


Figura 1.11 _ Grandezze di base.

1.2.3 Effetti dei campi elettromagnetici in ambito sanitario

Come già illustrato, i campi elettromagnetici interagiscono con le cariche elettriche presenti nel corpo umano, esercitando delle forze su queste, e di conseguenza provocano in ogni caso qualche misura di risposta, che può portare ad un effetto biologico, che non implica obbligatoriamente un effetto di danno alla salute o un effetto sanitario.

Come espresso dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) “*Un effetto biologico si verifica quando l'esposizione alle onde elettromagnetiche provoca qualche variazione fisiologica notevole o rilevabile in un sistema biologico*”, mentre “*Un effetto di danno alla salute si verifica quando l'effetto biologico è al di fuori dell'intervallo in cui l'organismo può normalmente compensarlo, e ciò porta a qualche condizione di detrimento della salute*”. Gli effetti biologici e sanitari sono diversi secondo la frequenza dei campi esterni che li inducono e l'importanza relativa di ogni effetto cambia gradualmente all'aumentare della frequenza. Inoltre in alcune zone dello spettro coesistono effetti diversi, tuttavia si possono schematicamente individuare intervalli caratterizzati da meccanismi di interazione, e quindi effetti biologici e sanitari, specifici.

Gli unici effetti sanitari accertati sono di natura acuta e quindi immediati, e si verificano solo al di sopra di determinati valori soglia di esposizione. E' proprio su questi effetti che si basano i limiti di esposizione raccomandati dalle più autorevoli organizzazioni internazionali.

Sono stati anche ipotizzati effetti a lungo termine che potrebbero derivare da esposizioni croniche a livelli di campo inferiori ai limiti, di questi effetti la ricerca non ha trovato risultati convincenti.

1.2.4 Effetti termici e non termici dei campi elettromagnetici ad alta frequenza

I campi elettromagnetici a radiofrequenza e microonde trasportano energia elettromagnetica che viene assorbita dai tessuti corporei e trasformata in calore provocando, un aumento di temperatura dell'intero corpo, secondo le differenti modalità di esposizione. Gli effetti di questo processo sono legati all'aumento di temperatura piuttosto che all'azione dei campi elettromagnetici di per sé; per questo motivo sono comunemente denominati *effetti termici*.

I campi elettromagnetici generati da sorgenti esterne interagiscono con le cariche e le correnti elettriche interne al corpo a qualunque livello di intensità; quindi in teoria qualunque esposizione provoca delle risposte che possono tradursi in effetti biologici.

E' necessario, considerare che esistono correnti elettriche endogene connesse a funzioni biologiche, di conseguenza se le correnti indotte sono dello stesso ordine di grandezza, o superiori a quelle fisiologiche è ragionevole attendersi risposte biologiche. Le stesse considerazioni possono essere fatte anche per gli effetti termici, osservabili solo se l'aumento della temperatura è superiore alle variazioni normalmente provocate da processi fisiologici o altri agenti esterni, comprese le condizioni climatiche.

A bassi livelli di esposizione risulta difficile discriminare i contributi endogeni da quelli dei campi esterni e le relative ricerche forniscono risultati incerti e contraddittori. E' per questo motivo che le soglie di osservabilità per gli effetti biologici risultano non ben definite. Sono stati documentati differenti effetti biologici, i quali non sono necessariamente nocivi: alcuni possono essere benefici, altri non avere conseguenze, ed altri infine provocare danni alla salute. I dati risultanti da vari decenni di ricerca, hanno permesso di individuare alcuni effetti sanitari. Gli unici effetti accertati sono quelli acuti, i quali si osservano solo al di sopra di determinate soglie, ovviamente più alte di quelle che provocano solo effetti biologici. Tuttavia è stata avanzata l'ipotesi che l'esposizione a campi di intensità inferiore alle soglie per l'insorgenza di effetti acuti, soprattutto se cronica, possa causare malattie degenerative ed in particolare il cancro (effetti a lungo termine). Anche nel caso degli effetti a lungo termine è necessario considerare separatamente i diversi intervalli di frequenza, in quanto i meccanismi d'interazione risultano differenti al variare della capacità dei campi di diversa frequenza di indurre campi e correnti all'interno delle strutture e dei compartimenti cellulari di fondamentale importanza, quali la membrana e il citoplasma.

La possibilità di effetti a lungo termine dell'esposizione a campi elettromagnetici a bassa o alta frequenza è stata oggetto di un crescente numero di studi negli ultimi anni.

Effetti termici

Gli effetti acuti derivanti dall'esposizione dei campi elettromagnetici si traducono principalmente in *effetti termici*. Il meccanismo di interazione alla base di questi effetti provoca un aumento della temperatura che viene contrastato da *meccanismi di termoregolazione*, come l'aumento della circolazione sanguigna, la sudorazione o la respirazione accelerata. Queste reazioni biologiche rallentano il processo di riscaldamento e riducono la temperatura a cui si stabilisce l'equilibrio termico (ISS).

Il trasferimento di calore all'interno dell'organismo avviene in minor parte per *conduzione termica* attraverso i tessuti e prevalentemente per trasporto (*convezione forzata*) da parte dei fluidi organici (sostanzialmente il sangue). Nel caso della conduzione, il calore passa spontaneamente dalle zone più calde alle più fredde, e come è noto, l'intensità del flusso termico è proporzionale alla differenza di temperatura fra i punti caldi e quelli freddi e alla conducibilità termica dei tessuti interposti. Nei tessuti vascolarizzati, grazie alla convezione forzata, il flusso sanguigno permette efficaci scambi termici fra le varie parti, indipendentemente dalla presenza di scambi termici. Se poi la temperatura di un tessuto vascolarizzato sale oltre i 42°C la *vasodilatazione* (meccanismo di risposta fisiologica) aumentando notevolmente la portata dei vasi sanguigni interessati e amplifica l'asportazione di calore delle zone surriscaldate (figura 1.12). Dopo che il calore raggiunge la superficie, viene ceduto all'ambiente attraverso vari meccanismi: convezione e conduzione, irraggiamento, evaporazione (sudorazione); inoltre il calore può essere eliminato attraverso la respirazione. Se il calore smaltito con i meccanismi suddetti non equilibra completamente quello prodotto dai processi metabolici più quello aggiuntivo proveniente dall'assorbimento di energia EM, si ha un rialzo termico al di sopra dei valori fisiologici (*ipertermia*) (Andreuccetti 2001) . Il tempo richiesto per raggiungere questo equilibrio è di poche decine di minuti. Sulla base di ciò i limiti di esposizione non devono essere intesi come istantanei ma, come valori da non superare in media entro un arco di tempo che in genere è pari a 6 minuti (ISS).

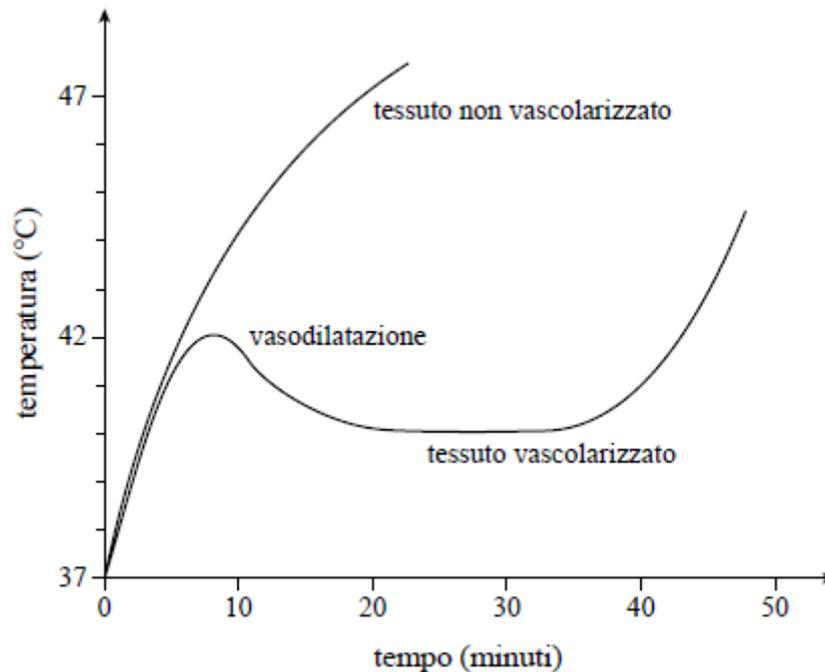


Figura 1.12_ Andamento della variazione di temperatura in vari tipi di tessuto biologico esposto a EMF.

Al persistere della fase di ipertermia possono derivare danni che sono in una prima fase reversibili, ma che possono diventare irreversibili per persistenze prolungate. Se questa condizione di sovra riscaldamento generale continua, può avvenire un collasso ipertermico, e se questo non è opportunamente controllato si può in casi estremi arrivare anche alla morte dell'individuo (Andreuccetti 2001).

A livello internazionale, sono stati stabiliti per la protezione del pubblico e dei lavoratori dei limiti di esposizione tali da limitare, anche nei soggetti più sensibili, *l'aumento stabile di temperatura*, la quale deve essere mantenuta ben al di sotto di 1°C. Questa variazione viene considerata inferiore a quelle associate ai normali processi fisiologici e di conseguenza tollerabile all'organismo anche per tempi prolungati (ISS).

Effetti non termici

Gli *effetti non termici*, derivati dall'esposizione a livelli tali da non dare luogo ad aumenti di temperatura dell'intero corpo esposto, o di sue parti, sono stati oggetto di numerose critiche sia di tipo sperimentale, sia di tipo epidemiologico, incentrate in gran parte sulla loro eventuale cancerogenicità.

Studi di genotossicità, condotti su cellule umane o animali dopo l'esposizione in vivo o in vitro, non hanno dimostrato incrementi nella frequenza di rotture del DNA a singolo filamento, né di altri indicatori di danno genotossico (aberrazioni cromosomiche, scambi

tra cromatidi fratelli, micronuclei) nei campioni esposti rispetto alla frequenza osservata nei campioni non esposti. Gli studi di genotossicità si sono rivelati quindi per la maggior parte negativi (ISS).

Un esempio di fenomeno apparentemente non termico, interpretabile come *microtermico* può essere l'effetto di sensazione uditiva, che si verifica in seguito ad esposizione a microonde modulate ad impulsi (esempio: le emissioni radar). Il meccanismo di azione più probabile pare una conversione termoelastica, dovuta a piccoli e rapidi surriscaldamenti dei tessuti della testa. A questo segue la formazione di onde acustiche che raggiungono la coclea, dove eccitano i recettori acustici.

Nel caso di effetti non termici si parla principalmente di:

1. *Meccanismi a livello molecolare*: abbiamo visto che l'energia dei fotoni, nel campo di frequenze di nostro interesse, non è sufficiente a produrre la rottura di legami chimici o ad attivare altre reazioni chimiche che diano luogo a cambiamenti molecolari permanenti. A queste frequenze sono invece possibili rotazioni delle molecole di acqua, comprese anche quelle della così detta acqua legata, una aggregazione di molecole di H₂O che riveste in forma ordinata (quasi "cristallina") la superficie di molte macromolecole. Sebbene studi su questo argomento vengano condotti da diverso tempo, non sono disponibili tutt'oggi risultati certi e definitivi. Azioni sono possibili anche su molte macromolecole, quali acidi nucleici e proteine, grazie al momento di dipolo elettrico di cui molte di queste grosse strutture molecolari sono dotate. Il meccanismo d'azione è sostanzialmente quello che dà luogo alla polarizzazione e alla conseguente cessione di energia.

2. *Interazioni a livello cellulare*: a questa scala, il meccanismo non termico più interessante è rappresentato dalla possibile azione del campo elettrico sulle membrane cellulari, il cui controllo elettrochimico sulle funzioni della cellula e più in generale su quelle dell'organismo, è ben noto (formazione del potenziale di membrana e suo ruolo nella conduzione dell'impulso nervoso). Le frequenze più opportune per generare una modificazione del potenziale di membrana sono quelle al di sotto di 1 MHz, mentre a frequenze più elevate il campo elettrico dà luogo a una d.d.p. attraverso la membrana estremamente piccola. È stato osservato un aumento nell'efflusso del calcio cellulare in presenza di campi a radiofrequenza modulati a frequenze di 6 - 25 Hz, con un massimo a circa 16 Hz, anche se il meccanismo di azione e le eventuali implicazioni biomediche non sono chiare (Adreuccetti et al. 2001).

1.2.5 Studi in vivo

Il modello animale, in questo caso mammifero, rappresenta un sistema di massima complessità biologica. Questo modello è insostituibile ad un certo livello della sperimentazione. Esistono norme etiche adibite alla guida di questa tipologia di studi, basate sul principio del *“Rispetto della vita e moderazione della sofferenza degli animali durante l’esperimento e al momento della soppressione”*.

Gli esperimenti svolti in vivo presentano enormi vantaggi quali:

- Monitoraggio di più parametri biologici contemporaneamente;
- Studio, anche in tempi prolungati di processi biologici complessi: cancerogenesi, teratogenesi, comportamento;
- Considerazione dei meccanismi di tossico-cinetica.

Nonostante gli importanti vantaggi questi studi presentano costi di applicazione elevati, e necessità di strutture e processi di stabulazione adeguati. Un altro aspetto limitativo consiste nell’ampia variabilità biologica delle rilevazioni sperimentali. Inoltre il modello animale non permette di ottenere alcuna informazione sul meccanismo di azione a livello molecolare.

Gli esperimenti di laboratorio eseguiti su animali per rilevare l’eventuale cancerogenicità dei campi a radiofrequenza e microonde, consistono in studi a lungo termine effettuati su roditori, animali geneticamente predisposti allo sviluppo di tumori, studi di co-cancerogenicità e studi su eventuali effetti facilitanti lo sviluppo di tumori da cellule neoplastiche trapiantate. Complessivamente, questi studi hanno dato risultati che mostrano una certa coerenza nell’indicare che non vi sia alcun effetto cancerogeno.

Alcuni studi sperimentali avevano segnalato la possibilità che l’esposizione a livelli subtermici di campi a radiofrequenza potesse aumentare la permeabilità della barriera emato-encefalica, con il conseguente passaggio di eventuali composti cancerogeni dal sangue al cervello, ma molti studi successivi non hanno confermato questa ipotesi.

Studi sul sistema nervoso umano

Tra gli studi riguardanti gli effetti sul sistema nervoso umano, diversi gruppi di ricerca non hanno trovato effetti dipendenti dalla modulazione nelle onde dell'attività elettrica spontanea del cervello con elettroencefalogramma (EEG).

Anche se un basso numero di studi ha riportato effetti modulazione-dipendenti in EEG spontaneo. Huber et al. (2002) hanno studiato gli effetti di campi RF a 900 MHz nel EEG spontaneo, utilizzando sia segnale non modulato (Continuous Wavelength, CW), che il segnale con modulazione simile a quello che viene emesso da un telefono GSM. Il potere delle bande alpha viene aumentato dall'esposizione a GSM, ma non dall'esposizione a CW.

Un altro studio ha misurato l'EEG in volontari svegli esposti a segnali GSM e CW alla frequenza di 900 MHz; anche in questo caso è stato riconosciuto l'aumento dell'attività delle bande alpha solo negli individui esposti a segnale GSM (Regel et al. 2007).

Hinrikus e collaboratori (2008), hanno osservato che campi elettromagnetici a 14 e 21 Hz producono un aumento della potenza di EEG nelle frequenze alpha e beta in volontari sani. Lo stesso gruppo di ricerca ha affermato che a basse modulazioni di frequenza (**7-217 Hz**) ci sono stati significativi aumenti dell'energia nel EEG per il 13-31% dei soggetti (Hinrikus et al. 2008). Anche Croft e collaboratori (2010), hanno riportato che a 900 MHz il segnale GSM ha causato un aumento della frequenza alpha in EEG di volontari adulti, mentre non sono state trovate evidenze di cambiamenti di EEG quando è stato utilizzato il segnale UMTS a 1900 MHz.

Sono stati pubblicati due studi sugli effetti su EEG registrati in condizione di riposo; Huber et al. (2002) hanno investigato sugli effetti di segnali GSM simili a quelli prodotti dai telefoni cellulari, a 900 MHz, sia in EEG a riposo che da svegli. Il segnale GSM modulato, ha prodotto significativi aumenti nella banda 12.25 - 13.5 Hz dell'EEG. Mentre un altro studio, investigando su effetti dei segnali a 900 MHz, ha evidenziato un aumento del flusso del sangue cerebrale. Questi risultati hanno portato gli autori a formulare l'ipotesi che la modulazione pulsata dei campi RF può indurre cambiamenti nella fisiologia del cervello (Huber et al. 2005), anche in relazione alla modulazione del segnale applicato.

Gli effetti riportati: cambiamenti nell'EEG, nel flusso del sangue cerebrale e nella *performance* in test di memoria, sono relativamente minori, e non portano a conclusioni su possibili effetti avversi per la salute (Jukka Juutilainen et al. 2011).

Studi su animali

Recentemente gli studi relativi agli effetti dell'esposizione a campi ad alta frequenza, hanno utilizzato prevalentemente i campi tipici dei sistemi di telefonia mobile. L'esposizione di animali di laboratorio a campi elettromagnetici ad un valore di SAR superiore a 4 W/kg ha presentato effetti caratteristici di risposte del sistema di termoregolazione, nel quale la temperatura corporea in un primo momento aumenta per poi stabilizzarsi in seguito all'attivazione dei meccanismi di termoregolazione (Michaelson 1983). La maggior parte degli studi su animali non ha individuato effetti correlati all'esposizione a campi a radiofrequenza sul cervello e sul sistema nervoso centrale, in particolare per quanto riguarda cambiamenti nelle espressioni geniche e nella permeabilità della barriera emato-encefalica. Nonostante questo Persson e collaboratori. (1997), hanno individuato un aumento della permeabilità della barriera emato-encefalica ad albumina endogena, in ratti esposti a EMF alla frequenza di 915 MHz. Questo effetto è stato correlato sia al valore di SAR, che alla modulazione pulsata.

Inoltre è possibile che l'esposizione a campi a radiofrequenza possa indurre modificazioni nell'attività colinergica nel cervello, anche se questi cambiamenti potrebbero essere una conseguenza della termoregolazione. L'esposizione a campi elettromagnetici ha prodotto cambiamenti delle funzioni colinergiche, che potrebbero avere effetti sulla memoria e l'apprendimento, anche se questa relazione non è chiara. Sono stati svolti alcuni studi in laboratorio con l'utilizzo di microonde pulsate che hanno riportato deficit comportamentali in dipendenza del campo, ma gli stessi effetti non sono stati riportati in studi simili che utilizzavano segnali GSM. Inoltre tali effetti si verificavano solo in correlazione di sensibili aumenti di temperatura corporea (NRPB Review).

Esiste un elevato numero di studi che affermano la non mutagenicità dei campi a microonde e quindi la mancata correlazione tra questi e lo sviluppo di cancerogenesi. Tuttavia recenti studi affermano che l'esposizione di roditori a campi microonde, a livelli di SAR dell'ordine di 1 W/kg, sia responsabile di rotture del filamento di DNA di tessuti testicolari e cerebrali (ICNIRP Review).

1.2.6 Studi in vitro

Gli studi condotti su cellule in coltura permettono di esaminare i possibili meccanismi di interazione dei campi a radiofrequenza con organismi e tessuti in ambiente controllato. Gli studi basati sulle colture cellulari possono impiegare:

- _ colture primarie, quindi prelevate estemporaneamente da tessuto, differenziate e labili;
- _ cellule “immortalizzate”: geneticamente modificate per essere in grado di proliferare all’infinito;
- _ cellule tumorali: derivanti da ceppi specifici in grado di proliferare in modo incontrollato in quanto tumorali;
- _ cellule staminali: totipotenti, capaci di dare origine a qualsiasi tipologia di differenziazione.

Gli esperimenti *in vitro* consentono una maggiore facilità nella reperibilità dei dati rispetto ai modelli *in vivo*, e quindi permettono di osservare anche una minima variabilità biologica. Un altro importante vantaggio di questi sistemi è rappresentato dall’uniformità genetica che consente un’elevata riproducibilità. Le colture cellulari possono essere manipolate geneticamente e si possono impiegare per studiare meccanismi d’azione a livello molecolare. In fine grazie all’utilizzo di sistemi *in vitro* è possibile verificare effetti di sostanze o agenti fisici direttamente su materiale umano. A scapito di questi pregi bisogna ricordare che tramite colture cellulari risulta impossibile rappresentare processi biologici complessi (es. tossicocinetica), e risulta difficoltoso estrapolare i risultati *in vivo*.

Studi di genotossicità

Gli studi sulla *genotossicità* si basano sulla rilevazione di danni al DNA in culture di linee cellulari, valutati tramite l’uso di elettroforesi (*Comet test*). Per questi test sono stati usati varie linee cellulari umane: fibroblasti normali e diploidi, linfociti, cellule di glioblastoma, cellule di neuroblastoma e leucociti. Inoltre sono state utilizzate anche cellule di granulosa di ratto e fibroblasti di topo. Nella maggior parte dei casi non sono stati osservati effetti relativi all’esposizione a campi RF, anche se in alcuni esperimenti sono stati riscontrati effetti positivi. Nel 1998 Philips et al., hanno riportato sia un aumento che una diminuzione di danni al DNA in cellule umane *Molt-4 lymphoblastoid* dopo esposizioni a campi RF.

Un aumento dei danni al DNA nelle cellule di neuroblastoma umani è stato recentemente riportato dopo l'esposizione combinata *menadione* (una sostanza chimica che induce produzione intracellulare di specie ossigenate reattive) ed a EMF con segnale CW a 972 MHz (Luukkonen et al. 2009). Al contrario non è stato rilevato alcun effetto in cellule esposte a segnale GSM modulato.

Gli unici effetti riportati statisticamente significativi, consistono nell'aumento della frequenza di micronuclei osservata dopo l'esposizione a RF EMF con segnale modulato alla frequenza di **1748 MHz**, mentre non sono stati rilevati effetti dopo l'esposizione allo stesso segnale non modulato (d'Ambrosio et al. 2002).

Effetti non genotossici cancro-rilevanti

Sono stati studiati svariati *endpoint* biologici in colture cellulari esposte a campi RF, correlati alla crescita, allo stress ossidativo e alla morte cellulare. La maggior parte di questi studi ha dato risultati negativi. Diversi studi hanno misurato l'attività *dell'ornitina decarbossilasi* (ODC), un enzima che riflette l'aumento della proliferazione cellulare.

La maggior parte degli studi che hanno rilevato effetti sull'apoptosi, non hanno mostrato differenze negli effetti tra segnali modulati e segnali CW (Juutilainen et al. 2011). Al contrario, tre differenti studi basati l'esposizione combinata di campi RF e agenti che inducono l'apoptosi, hanno mostrato effetti sull'apoptosi imputabili alla modulazione del segnale.

Capri et al. nel 2004, hanno sottoposto linfociti umani derivanti da donatori sani a RF EMF a 900 MHz, con segnale modulato in modalità GSM e scoprirono che l'apoptosi indotta dal *2-desossi-D-ribosio* è aumentata solo dal segnale modulato. Un altro studio condotto nello stesso anno riporta che l'apoptosi era aumentata in seguito ad esposizione a RF EMF in modalità GSM in cellule di lievito mutate *Cdc-48*, le quali sono state sottoposte ad elevate temperature e radiazioni UV allo scopo di indurre apoptosi (Markkannen 2004).

In fine Hoyto e collaboratori (2008) provarono che l'attività della *caspase 3* di cellule L929 trattate con *menadione* mostrava un aumento conseguente all'esposizione a segnali RF modulati GSM, mentre il segnale CW non dava effetti.

Effetti sull'espressione genica e proteica

Molti studi sono stati rivolti ai possibili effetti dell'esposizione a RF EMF sull'espressione genica e proteica; in particolare, riguardo alle *heat shock proteins* (HSP), è stato visto un aumento dell'espressione del gene *HSP70* in seguito all'esposizione a segnali GSM con modulazione di **217 Hz** (Czyz et al. 2004).

Franzellitti et al. (2008), hanno osservato che l'esposizione di cellule di trofoblasto umano a RF EMF con segnale modulato in modalità GSM, porta all'aumento di espressione dell'isoforma inducibile del gene *HSP70*, mentre questo non avviene in assenza di modulazione del segnale. Inoltre non sono stati rilevati effetti sull'espressione della proteina corrispondente.

1.2.7 Studi epidemiologici

Le ricerche su possibili effetti negativi per la salute correlati a livelli di esposizione, utilizzano spesso studi epidemiologici. L'epidemiologia analitica ha lo scopo di identificare e/o descrivere relazioni tra esposizioni ad agenti fisici, chimici e biologici ed effetti sulla salute. Grazie a questa metodologia di studio è possibile valutare effetti a lungo termine di un certo tipo di esposizione. Anche se presentano una rilevanza diretta, i risultati degli studi epidemiologici non possono fornire una sufficiente prova di relazione causale in assenza di plausibilità biologica, o del sostegno di dati forniti da studi sperimentali, in particolare quando i rischi suggeriti dagli studi sono piccoli, come nel caso dei campi elettromagnetici (ICNIPR Review).

Gli studi epidemiologici sugli effetti a lungo termine dei campi elettromagnetici a radiofrequenza e microonde, sono stati studiati soprattutto tramite indagini sull'incidenza di tumori in gruppi di popolazione esposti in ambito professionale o residenziale, e studi sugli utilizzatori di cellulari. Anche in questo ambito i dati risultano contraddittori; alcuni studi su individui professionalmente esposti hanno indicato l'aumento di alcune neoplasie, ma altri non hanno evidenziato corrispondenza tra esposizione e patologie. Risulta difficile sintetizzare quantitativamente l'evidenza fornita da questi studi, a causa della disomogeneità dei disegni sperimentali. Inoltre nessuno di questi studi fornisce indicazioni quantitative adeguate sull'intensità dell'esposizione. La mancanza di queste indicazioni determinano il limite fondamentale anche di alcuni studi condotti sulla frequenza di neoplasie tra i residenti in prossimità di antenne televisive.

Le indagini condotte fin'ora nell'insieme, non forniscono indicazioni coerenti di una correlazione tra forme tumorali ed esposizioni ai campi elettromagnetici generati da trasmettitori televisivi. Riguardo ulteriori indagini di questo tipo non è ragionevole attendersi risultati più conclusivi per i limiti intrinseci a tutte le analisi epidemiologiche (cioè basate su dati aggregati e non su dati individuali).

Studi britannici, in un primo tempo, avevano confermato un aumento di leucemie e linfomi negli abitanti delle zone intorno ad un'antenna televisiva. Ma quando l'indagine è stata estesa alle 20 maggiori antenne del paese, aumentando la popolazione in studio, e quindi la potenza statistica dell'indagine, non è stato trovato alcun aumento di rischio.

Nel 1997 è stato raccomandato, da un gruppo di esperti dell'UE lo sviluppo di ricerche epidemiologiche di ampie dimensioni per indagare la possibilità di effetti a lungo termine associati all'uso dei telefonini. La **IARC** ha coordinato uno studio epidemiologico internazionale, denominato progetto *Interphone*, che ha coinvolto numerosi Paesi quali Australia, Canada, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Inghilterra, Israele, Italia, Giappone, Nuova Zelanda, Norvegia e Svezia. Il progetto *Interphone* è costituito da diversi studi nazionali caso-controllo basati su un protocollo comune, e mirava innanzitutto a valutare l'ipotesi che l'uso del cellulare fosse associato ad un incremento dell'incidenza di tumori sia cerebrali, quali glioma e meningioma, sia del nervo acustico e delle ghiandole salivari. L'Italia ha partecipato a questo studio con un gruppo di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità. Lo studio ha preso in considerazione sia persone malate che soggetti sani di controllo, ai quali è stato chiesto di indicare quando avevano iniziato a usare il cellulare, il numero di telefonate effettuate e il tempo medio quotidiano trascorso al telefonino. Lo studio non ha riscontrato aumento di rischio di gliomi o meningiomi cerebrali, tra gli utilizzatori regolari di telefoni cellulari, e neanche per i partecipanti che usavano il telefonino da almeno dieci anni, mentre è stato osservato un apparente incremento del rischio di glioma (e in misura minore meningioma) per quanto riguarda il rischio associato a livelli crescenti d'uso del cellulare, tra gli utilizzatori classificati nel decile più elevato di ore cumulative d'uso. Tuttavia, in questa categoria, i livelli d'uso sono inverosimili (5 o 12 ore al giorno) e sono stati riferiti più frequentemente da casi che non da controlli. La IARC nel 2011 ha classificato, sulla base di questi dati, i **campi elettromagnetici a radiofrequenza e microonde** come “**possibilmente cancerogeni**” (Gruppo B), in quanto l'evidenza epidemiologica è stata giudicata “limitata”, in quanto un'interpretazione causale delle evidenze è stata ritenuta credibile, ma non è possibile escludere con certezza un ruolo del caso, di distorsioni o di fattori di confondimento.

Infatti alcuni membri del Gruppo di Lavoro della IARC che ha effettuato la classificazione hanno ritenuto che l'evidenza epidemiologica fosse “*inadeguata*” (grado di evidenza inferiore a “*limitata*”). Successivamente si è espressa OMS, in favore di ulteriori ricerche giustificate dal crescere dell'utilizzo dei telefoni cellulari e dalla carenza dei dati relativi a tempi di utilizzo superiore a 15 anni. L'OMS non ha invece suggerito revisioni degli attuali standard di protezione fissati a livello internazionale (finalizzati alla previsione degli effetti noti, di natura termica, dei campi elettromagnetici a radiofrequenza), né ha suggerito di adottare misure precauzionali di limitazione delle esposizioni connesse all'utilizzo di telefoni cellulari.

1.2.8 Effetti dei campi elettromagnetici sull'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi

Gli effetti dei campi elettromagnetici sull'enzima acetilcolinesterasi (AChE) sono stati studiati a partire dagli anni 80; sebbene tali studi non siano per il momento numerosi, presentano nella maggior parte dei casi un effetto di aumento o diminuzione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito ad esposizione a EMF. Lo studio più recente è quello di Ravera (2010), nel quale vengono trattati gli effetti degli ELF sull'attività dell'AChE. Lo studio è stato effettuato con campi sinusoidali a frequenze di 50 Hz, e si è osservato un conseguente decremento dell'attività enzimatica di circa il 27%. Anche nello studio condotto da Morelli e collaboratori (2005) vengono testati gli effetti dei ELF-EMF, in questo caso alla frequenza di 75 Hz su differenti enzimi associati alle membrane. In questo caso l'enzima esposto a ELF-EMF mostra un abbassamento della sua attività di circa il 60%. Nello stesso anno uno studio sugli effetti dei campi elettromagnetici a microonde (2.45 GHz) sull'attività enzimatica dell'AChE, riporta un abbassamento della stessa di 8,4% dopo un'esposizione di 48 ore, arrivando alla conclusione che l'esposizione a microonde produce effetti non termici, intensità-dipendenti, nell'attività dell' AChE presente nei muscoli scheletrici nella rana (Vukova et al.,2005).

Nello studio di Krokosz et al. (2005), vengono esaminati gli effetti prodotti dai EMF ad alta frequenza. L'attività dell'enzima presente in eritrociti umani viene misurata in seguito ad esposizione a raggi x, con il risultato di una minore attività di AChE nei campioni esposti rispetto ai controlli. Nel 1993 Kunjilwar e Behari, riportano una riduzione dell'attività dell' AChE in cellule cerebrali di ratto a seguito di esposizioni a RF 147 MHz,

a 16 e 76 Hz. Si tratta di uno studio che esamina effetti a lungo termine di esposizione sul sistema colinergico nel cervello di ratto con tempi di esposizione di 30-35 giorni.

Ulteriori ricerche hanno dato come risultato una riduzione dell'attività dell'AChE in cellule di midollo osseo murino a 1.4 Tesla (Stagemann 1992). Il primo lavoro, pubblicato nel 1980, si occupò dello studio dell'attività di AChE nelle cellule di cuore di ratto sottoposte a campi elettromagnetici (80 kA/m), con conseguente aumento dell'attività enzimatica. In tabella 1.3 sono elencati gli studi sopracitati e ulteriori lavori che presentano l'AChE come possibile bersaglio dei campi elettromagnetici.

Autore	Attività AChE
Calzia 2011	Ridotta
Morelli 2005	Ridotta
Vukova 2005	Aumentata
Krokosz 2005	Ridotta
Kunjilwar 1993	Ridotta
Stagemann 1992	Ridotta
Moses 1992	Ridotta
Dutta 1991	Aumentata
Galvin 1981	Invariata
Abramov 1980	Aumentata

Tabella 1.3_Studi riguardanti l'attività enzimatica dell'AChE come bersaglio di campi elettromagnetici.

2. LEGISLAZIONE

2.1 QUADRO DI RIFERIMENTO NORMATIVO

Per quanto riguarda i campi elettromagnetici, gli enti istituzionali responsabili dell'attuale legislazione normativa, sono rappresentati principalmente da: ICNIRP (*International Commission of Non Ionizing Radiation Protection*), CENELEC (*Comitè Européen de Normalisation Electrotechnique*), CEI (*Comitato Elettrotecnico Italiano*).

L'**ICNIRP** è la Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non Ionizzanti, costituita a Montreal nel Maggio del 1992 durante l'ottavo Congresso Internazionale dell'IRPA (*International Ration Protection Association*). L'ICNIRP consiste in un gruppo indipendente di esperti, costituito per valutare lo stato delle conoscenze relative agli effetti delle NIR sulla salute e sul benessere dell'uomo, si occupa quindi di fornire, quando è necessario, raccomandazioni su basi scientifiche per la protezione dalle radiazioni non ionizzanti, compresa l'emanazione di linee guida per la limitazione delle esposizioni. L'ICNIRP pubblicò nel 1998 le "*Linee guida per la limitazione dell'esposizione a campi elettrici e magnetici variabili nel tempo ed a campi elettromagnetici (fino a 300 GHz)*", con l'obiettivo principale di stabilire linee guida per la limitazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici, allo scopo di fornire una protezione contro effetti conosciuti che siano nocivi per la salute.

La strategia principalmente utilizzata dall'ICNIRP consiste nel definire *una restrizione di base* (limitazioni alle esposizioni ai campi elettrici, magnetici, elettromagnetici, basate su effetti sanitari accertati) , in termine di grandezza biologicamente efficace e collegare questa restrizione a *livelli di riferimento*, espressi in termini di grandezza direttamente misurabili per l'esposizione esterna. Questi livelli di riferimento hanno lo scopo di stabilire se le restrizioni di base siano verosimilmente rispettate. L'osservanza dei livelli di riferimento garantisce il rispetto della corrispondente restrizione di base, mentre se al contrario, il valore misurato o calcolato supera il livello di riferimento non ne consegue necessariamente che venga violata la restrizione di base. In ogni caso, quando viene superato un livello di riferimento, è necessario verificare il rispetto della corrispondente restrizione di base e stabilire se siano necessarie misure di protezione aggiuntive.

In tabella 2.1 sono elencate le restrizioni di base sulla densità di corrente, sul SAR mediato nel corpo intero e sul SAR localizzato, per frequenze comprese tra 1 Hz e 10 GHz. Mentre in tabella 2.2 sono elencate le restrizioni sulla densità di potenza nell'intervallo di frequenza tra 10 GHz e 300 GHz.

Caratteristiche dell'esposizione	Intervallo di frequenza	Densità di corrente per la testa ed il tronco (mA/m ²)(rms)	SAR mediato sul corpo intero (W/kg)	SAR localizzato (testa e tronco)	SAR localizzato (arti)
Esposizione professionale	fino a 1 Hz	40	-	-	-
	1-4 Hz	40/f	-	-	-
	4 Hz-1 kHz	10	-	-	-
	1-100 kHz	f/100	-	-	-
	100 kHz-10 MHz	f/100	0,4	10	20
	10 MHz-10 GHz	-	0,4	10	20
Esposizione del pubblico	fino a 1 Hz	8	-	-	-
	1-4 Hz	8/f	-	-	-
	4 Hz-1 kHz	2	-	-	-
	1-100 kHz	f/500	-	-	-
	100 kHz-10 MHz	f/500	0,08	2	4
	10 MHz-10 GHz	-	0,08	2	4

Figura 2.1_ Restrizioni di base per campi elettrici e magnetici variabili nel tempo con frequenze fino a 10 GHz.

Caratteristiche dell'esposizione	Densità di potenza (W/m ²)
Esposizione professionale	50
Esposizione del pubblico	10

Figura 2.2_ Restrizioni di base per la densità di potenza per frequenze comprese tra 10 e 300 GHz.

2.2 NORMATIVA EUROPEA

La Risoluzione sulla "Lotta contro gli inconvenienti provocati dalle radiazioni non ionizzanti" prende in considerazione l'inquinamento elettromagnetico provocato da trasporto e distribuzione di elettricità, apparecchiature elettrodomestiche, tecnologie utilizzate nelle industrie e nei servizi, e telecomunicazioni. Tale documento approvato dal Parlamento Europeo il 5 maggio del 1994 chiede alla Commissione e al Consiglio di definire una strategia basata su cambiamenti tecnologici e strutturali volta a controllare le suddette fonti di campi elettromagnetici. Nella stessa Risoluzione vengono fissati due principi direttori:

- Il *principio di precauzione*, il quale prevede, in caso di dubbio sul livello del rischio, di adottare l'impostazione più garantista per la salute del cittadino e consente di minimizzare il rischio, ricorrendo all'opzione zero.

- Il *criterio ALARA (As Low Reasonably Achievable)*, secondo cui, una volta fatta la scelta tecnologica, l'esposizione alle radiazioni deve essere più debole possibile.

Considerando l'incertezza sui possibili effetti biologici e sanitari dei campi ai giorni d'oggi, qualsiasi tipologia di politica ambientale basata su limitazioni di esposizioni, restrizioni di base o livello di riferimento, è strettamente dipendente dal principio di precauzione.

La normativa europea prevede la Raccomandazione 1999/519/CE del 12 luglio 1999, la quale rappresenta un documento del Consiglio relativo alla limitazione dell'esposizione della popolazione ai campi elettromagnetici da 0 a 300 GHz. Obiettivo della suddetta raccomandazione, è l'istituzione attraverso raccomandazioni rivolte agli stati membri, di un quadro comunitario che tratta l'esposizione ai campi elettromagnetici in un'ottica di protezione della popolazione. E' per questo motivo che viene applicata soprattutto ai luoghi in cui i cittadini permangono per un tempo significativo rispetto agli effetti contemplati dalla presente raccomandazione. Gli Stati Membri hanno la possibilità di fornire un livello di protezione maggiore di quello indicato dalla Raccomandazione stessa.

Nel 2004 è stata emessa una Direttiva Europea per la protezione dei lavoratori dai EMF; 2004/2/CE, la quale però non tiene conto degli effetti a lungo termine, e degli effetti cancerogeni.

Nello stesso anno il Parlamento Europeo e il Consiglio dell'Unione Europea hanno emanato la direttiva 2004/40/CE sulle *“prescrizioni minime di sicurezza e di salute relative all'esposizione dei lavoratori ai rischi derivanti dagli agenti fisici (campi elettromagnetici)”*. La suddetta direttiva riprende i limiti di base e i livelli di riferimento per l'esposizione professionale forniti dall'ICNIRP. In essa sono presi in considerazione gli effetti nocivi a breve termine, derivanti dalla circolazione di correnti indotte e dall'assorbimento di energia, nonché da correnti di contatto.

La Commissione Europea nel 2008 ha annunciato la proroga dell'attuazione della precedente direttiva comunitaria, tramite la direttiva 2008/46/CE. Con questa proposta viene modificata la data di recepimento della direttiva 2004/40/CE al 30 aprile 2012, allo scopo di concedere tempo necessario alla preparazione di un testo rettificato che tenga in maggiore considerazione alcune tecnologie che si avvalgono di campi statici o a bassissima frequenza, come la risonanza magnetica per immagini (MRI).

2.3 NORMATIVA NAZIONALE

Per quanto riguarda la legislazione a livello nazionale, esistono diverse normative o normative proposte, sia di carattere generale sia per le ELF, RF e MO:

- DPCM del 23/4/1992 e 28/9/1995 “*limiti di esposizione alle frequenze industriali (50 Hz)*”;
- L.R. 10 del 22 Febbraio 1993 “*Norme in materia di opere relative a linee e ad impianti elettrici fino a 150 kW*”;
- DM n° 381 del 10/9/1998 “*Regolamento recante norme per la determinazione dei tetti di radiofrequenza compatibili con la salute umana*”;
- L.R. 30 del 31 Ottobre 2000 “*Norme per la tutela della salute e la salvaguardia dell’ambiente dall’inquinamento elettromagnetico*”.

Legge 22 febbraio 2001 n.36 “*Legge quadro sulla protezione dalle esposizioni a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici*”. Su questa legge si basa la normativa di riferimento nazionale, e ha come scopo di dettare i principi fondamentali diretti a:

- _ Garantire la tutela della salute dei lavoratori e della popolazione dagli effetti dell’esposizione e determinati livelli di campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici ai sensi dell’articolo 32 della Costituzione;
- _ Promuovere la ricerca scientifica per la valutazione degli effetti a lungo termine ed attivare misure di cautela da adottare in applicazione del principio di precauzione;
- _ Assicurare la tutela dell’ambiente e del paesaggio e promuovere l’innovazione tecnologica e le azioni di risanamento volte a minimizzare l’intensità e gli effetti dei campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici secondo le migliori tecnologie disponibili.

L’ambito di applicazione della suddetta legge ha per oggetto gli impianti, i sistemi e le apparecchiature per usi civili, militari e delle forze di polizia, che possano comportare l’esposizione dei lavoratori e della popolazione ai campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenze comprese tra 0 Hz e 300 GHz. La presente legge in particolare si applica agli elettrodi ed agli impianti radioelettrici compresi gli impianti per telefonia mobile, i radar e gli impianti di radiodiffusione. Inoltre le disposizioni della presente legge non si applicano nei casi di esposizione intenzionale per scopi diagnostici o terapeutici.

Successivamente è stato emanato il **DPCM dell' 8 luglio 2003**, come decreto applicativo della suddetta legge, il quale tratta “*Fissazione dei limiti di esposizione, dei valori di attenzione e degli obiettivi di qualità per la protezione della popolazione dalle esposizioni a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici generati a frequenze comprese tra 100 kHz e 300 GHz*”. Il presente decreto prevede la fissazione dei limiti di esposizione, dei valori di attenzione e degli obiettivi di qualità per la protezione della popolazione dalle esposizioni a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici generati a frequenze comprese tra 100 kHz e 300 GHz. Questo decreto tiene conto sia degli effetti a breve termine, sia di possibili effetti a lungo termine nella popolazione dovuti all'esposizione a campi elettromagnetici generati da sorgenti fisse con con frequenza sopracitata. In questo documento vengono inoltre fissati gli *obiettivi di qualità, limiti di esposizione e valori di attenzione*, ai fini della progressiva minimizzazione dell'esposizione ai campi medesimi, e l'individuazione delle tecniche di misurazione dei livelli di esposizione. I *limiti di esposizione, i valori di attenzione e gli obiettivi di qualità*, non si applicano ai lavoratori esposti per ragioni professionali oppure per esposizioni a scopo diagnostico o terapeutico. Nell'articolo 3 sono riportati *i limiti di esposizione e i valori di attenzione*. Nel caso di esposizione a impianti che generano campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenze comprese tra 100 kHz e 300 GHz, non devono superare i limiti di esposizione riportati in tabella 2.3.

Limiti di esposizione	Intensità di campo elettrico E (V/m)	Intensità di campo magnetico H (A/m)	Densità di potenza D (W/m²)
0,1 < f = 3 MHz	60	0,2	-
3 < f = 3000 MHz	20	0,05	1
3 < f = 300 GHz	40	0,1	1

Tabella 2.3_ Limiti di esposizione a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenza compresa tra 100 kHz e 300 GHz.

L'articolo 4, invece espone gli *obiettivi di qualità* ai fini della progressiva minimizzazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici. In tabella 2.4 sono illustrati i valori di immissione, che non devono essere superati, dei campi oggetto del presente decreto, calcolati o misurati all'aperto nelle aree intensamente frequentate. Anche per i campi a frequenza estremamente bassa è stato formulato lo stesso decreto applicativo: **DPCM 8 luglio 2003** “*Fissazione dei limiti di esposizione, dei valori di attenzione e degli obiettivi di qualità per la protezione della popolazione dalle esposizioni ai campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici alla frequenza di rete (50 Hz) generati dagli elettrodi*”. Le

disposizioni del presente decreto verranno tralasciate in quanto non sono d'interesse al fine del lavoro di tesi.

Obiettivi di qualità	Intensità di campo elettrico E (V/m)	Intensità di campo magnetico H (A/m)	Densità di potenza D (W/m ²)
0,1 MHz < f = 300 GHz	6	0,016	0,10 (3MHz-300 GHz)

Tabella 2.4_ Obiettivi di qualità riferiti all'esposizione a campi elettrici, magnetici, ed elettromagnetici compresa tra 100 kHz e 300 GHz.

Nel 2007, lo stato italiano emanò la **Legge 3 agosto 2007, n.123** “*Misure in tema di tutela della salute e della sicurezza sul lavoro e delega al governo per il riassetto e la riforma della normativa in materia*”. La suddetta legge delega il Governo ad adottare entro nove mesi della data di entrata in vigore della presente, uno o più decreti legislativi per il riassetto e la riforma delle disposizioni vigenti in materia di salute e sicurezza dei lavoratori nei luoghi di lavoro, garantendo l'uniformità della tutela dei lavoratori sul territorio nazionale attraverso il rispetto dei livelli essenziali delle prestazioni concernenti i diritti civili e sociali, anche con riguardo alle differenze di genere e alle condizioni dei lavoratori immigrati.

Successivamente nel **2008** è stato emanato il **Decreto Legislativo 9 Aprile n.81** “*Attuazione dell'art.1 della legge 3 agosto 2007 in materia della tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro*”, nel quale vengono definiti i criteri di applicazione della legge n.123. Il campo di applicazione del presente decreto comprende agenti fisici, intesi come rumore, ultrasuoni, infrasuoni, vibrazioni meccaniche, campi elettromagnetici, radiazioni ottiche di origine artificiale, il microclima, le atmosfere iperbariche che possono comportare rischi per la salute e la sicurezza dei lavoratori. Il datore di lavoro è tenuto a valutare tutti i rischi derivanti da esposizione ad agenti fisici in modo da identificare ed adottare le opportune misure di prevenzione e protezione, nell'ambito della valutazione del rischio. I lavoratori non devono, in nessun caso, essere esposti a valori superiori ai *valori limite di esposizione*, che nel caso di campi elettromagnetici, rimangono quelli suggeriti dalla Raccomandazione 1999/512/CE.

2.4 NORMATIVA REGIONE EMILIA ROMAGNA

La Regione Emilia Romagna al momento non dispone di alcun quadro di riferimento normativo organico, in materia di elettromagnetismo. Considerando l'irrefrenabile sviluppo di impianti per la produzione e trasmissione di energia elettrica e la diffusione di nuovi strumenti di telecomunicazione come emittenti radio-televisive e sistemi per la telefonia mobile. L'Emilia Romagna ha deciso di pubblicare nel Novembre del 2000 la **legge regionale 31 ottobre 2000, n.30** "Norme per la tutela della salute e la salvaguardia dell'ambiente dall'inquinamento elettromagnetico". Con la pubblicazione della **delibera della giunta Giunta regionale 20/02/2001, n.197**, direttiva per l'applicazione della legge regionale 31/10/2000, n.30 e con le modifiche apportate dalla **Dgr E.R. del 17 Luglio 2001 n. 1449** "Modifiche per l'inserimento di alcuni elementi di semplificazione alla D.G.R. 197/2001", viene completato il quadro normativo regionale in concomitanza con l'approvazione della legge 22/02/2001, n.36, "Legge quadro sulla protezione delle esposizioni a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici".

La legge regionale del 2000 e le sue direttive applicative del 2001 si basano su norme atte al perseguimento prioritario della prevenzione, tutela sanitaria della popolazione e alla salvaguardia dell'ambiente dall'inquinamento elettromagnetico, coordinandole con le scelte della pianificazione urbanistica. Vengono quindi coordinate con le scelte di localizzazione delle emittenti radio, di quelle televisive, degli impianti di telefonia mobile, compresi gli impianti di sistemi *dect* (Digital Enhanced Cordless Telecommunication), e delle linee e degli impianti elettrici per il rispetto dei valori di cautela fissati nella normativa statale e il perseguimento degli obiettivi di qualità. Gli enti locali nell'esercizio delle loro competenze e della pianificazione territoriale e urbanistica perseguono obiettivi di qualità per la minimizzazione del rischio della popolazione ai campi elettromagnetici.

I gestori degli impianti di telefonia mobile, devono presentare ai Comuni il programma annuale delle installazioni fisse da realizzare. Tale programma deve indicare la localizzazione puntuale degli impianti, individuare le aree circoscritte, di ampiezza non superiore a 150 m di raggio dal punto ottimale di collocazione dell'impianto, dove il gestore per garantire il servizio secondo gli standard stabiliti dalla concessione ministeriale, prevede di installare gli impianti (*art.8*). Risulta vietata dalla legge la localizzazione di impianti fissi di telefonia mobile in aree destinate ad attrezzature sanitarie, assistenziali e scolastiche, nelle zone di parco classificate A, e nelle riserve naturali ai sensi della legge regionale 11 del 1998, nonché su edifici di valore storico-architettonico e monumentale (*art.9*). Con la suddetta legge inoltre viene istituito il catasto

degli impianti fissi di telefonia mobile, il quale prevede che i Gestori forniscano ai Comuni la mappa completa degli impianti fissi già installati, entro sei mesi dalla data di entrata in vigore della legge (*art.11*).

Per gli impianti di distribuzione e trasmissione dell'energia elettrica vengono definite le linee e gli impianti elettrici o elettrodotti e la loro classificazione. L'*obiettivo di qualità* è individuato nella misura di **0,2 μT** di induzione magnetica da perseguire attraverso gli strumenti urbanistici, tenendo conto delle particolari situazioni territoriali al fine di contemperare le esigenze di minimizzazione del rischio con quelle di sviluppo territoriale, considerando che la tutela della salute deve essere garantita attraverso il rispetto di opportuni valori di cautela e limiti di esposizione. Il limite di induzione magnetica è soggetto ad una diminuzione di restrittività al valore di **0,5 μT** , per alcune situazioni territoriali che prevedono la presenza di aree di sviluppo urbanistico, in particolare aree di espansione con piani attuativi già approvati o aree di completamento già dotate delle opere di urbanizzazione che risultino in prossimità di impianti esistenti o dove si manifesti la necessità di potenziare la rete elettrica. A questo proposito sono state definite le procedure per l'individuazione delle *fasce di rispetto* e dei *corridoi di fattibilità*. La Pianificazione Territoriale Provinciale (PTCP o piano stralcio) individua i corridoi di fattibilità ambientale che comprendono i tracciati e le aree più idonee ove localizzare e realizzare gli impianti di trasmissione e distribuzione dell'energia elettrica.

3. SISTEMI BIOLOGICI DI STUDIO

3.1 SISTEMA COLINERGICO

Molteplici studi effettuati nell'ambito dei campi elettromagnetici, a partire dagli anni 80, utilizzano come bersaglio l'enzima *acetilcolinesterasi* (AChE). Questo enzima è coinvolto nell'idrolisi dell'*acetilcolina* (ACh) (figura 3.1), il quale è un estere di acido acetico e colina e presenta la seguente struttura:

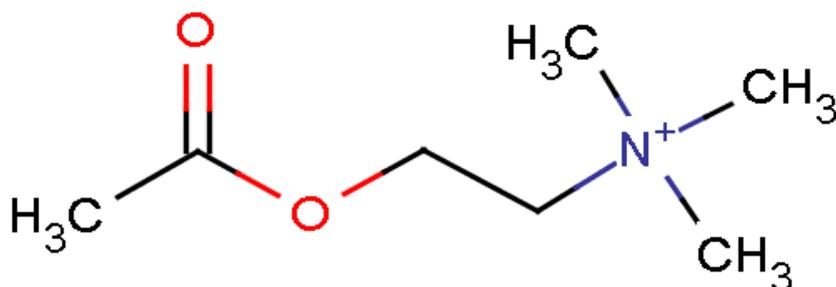


Figura 3.1 Struttura molecolare del neurotrasmettitore ACh.

L'*ACh* è responsabile della trasmissione del segnale nervoso tra due neuroni, o tra neuroni o altre tipologie di cellule, come muscoli e ghiandole. La neurotrasmissione può avvenire sia a livello di *Sistema nervoso centrale* (SNC), il quale riceve, integra ed elabora gli stimoli afferenti provenienti dal *Sistema nervoso periferico* (SNP). Anche quest'ultimo è adibito alla neurotrasmissione ed è in continuità con il SNC, ricevendo a sua volta stimoli da questo. La neurotrasmissione consiste nella trasmissione del segnale tramite un insieme di complessi meccanismi che avvengono all'interno del sistema nervoso degli animali, come conseguenza alla ricezione di informazioni relative all'ambiente interno ed esterno dell'organismo. I *neuroni* costituiscono la rete di cellule responsabili della mediazione di questi meccanismi, i quali ricevono le informazioni, le integrano e informano altre cellule affinché rispondano in modo appropriato. La comunicazione tra i neuroni del sistema nervoso avviene attraverso un *potenziale di azione*, che consiste in un evento per mezzo del quale una cellula nervosa o muscolare opportunamente stimolata, subisce una variazione verso valori positivi del suo potenziale di membrana. La struttura intracellulare adibita alla trasmissione dei potenziali di azione prende il nome di *sinapsi*. La sinapsi è una struttura altamente specializzata che consente il trasferimento dell'impulso nervoso dal *neurone presinaptico* al *neurone postsinaptico* o *effettore* postsinaptico (figura 3.2), producendo effetti (apertura canali ionici, risposte metaboliche, ecc..).

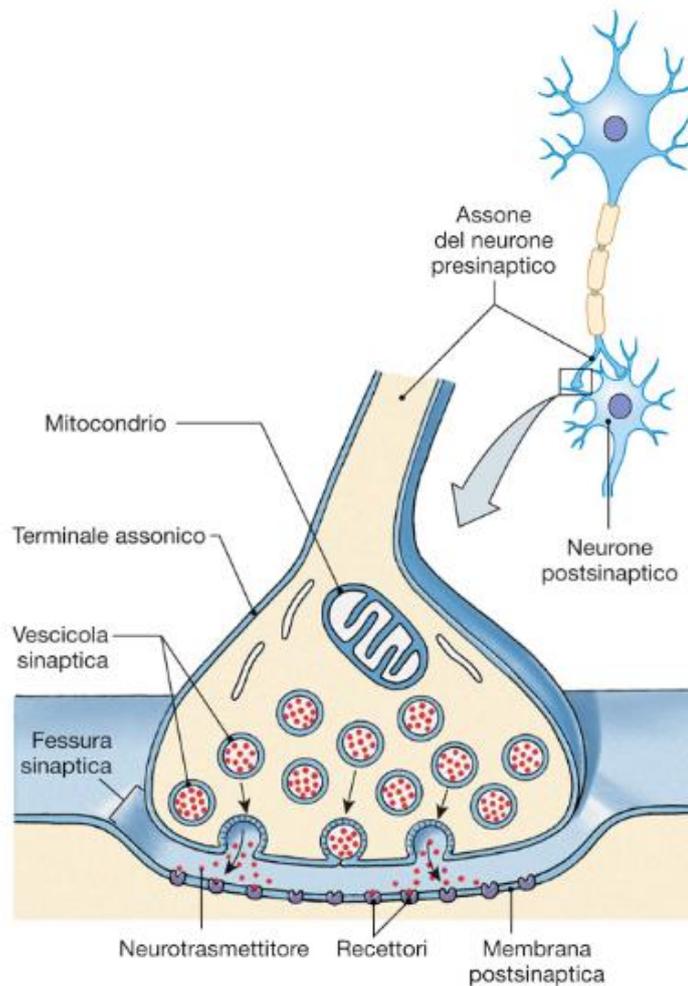


Figura 3.2_Sinapsi chimica.

In base alla modalità con cui si esplicita la trasmissione, esistono due tipi di sinapsi: le *sinapsi elettriche* e le *sinapsi chimiche*. Nella sinapsi elettrica la trasmissione del segnale avviene tramite un flusso di correnti elettroniche, come avviene durante la propagazione dell'impulso lungo la fibra nervosa. Nella sinapsi elettrica una cellula stimolabile ed un neurone sono tra loro connesse mediante una giunzione comunicante detta *gap junction*. Le giunzioni comunicanti consentono il rapporto tra le cellule grazie al passaggio diretto in entrambe le direzioni, anche se esistono sinapsi elettriche che conducono preferenzialmente in una direzione piuttosto che in un'altra.

Una sinapsi chimica è caratterizzata da una trasmissione mediata da una sostanza chimica, denominata *neurotrasmettitore* rilasciata dalla terminazione pre-sinaptica. Nei vertebrati, e quindi nell'uomo, la trasmissione sinaptica avviene prevalentemente con un meccanismo di tipo chimico. In questo lavoro di tesi l'attenzione sarà rivolta a questo tipo di sinapsi.

Nella sinapsi chimica la terminazione presinaptica che si avvicina al soma cellulare assume una forma a fiasco schiacciato o *bottone*. Il bottone sinaptico contiene molti mitocondri e un elevato numero di vescicole sinaptiche, al cui interno è presente il neurotrasmettitore e

per questo viene definito colinergico. Gli impulsi nervosi costituiscono una modalità di trasmissione di segnali che si basa sull'alterazione del normale equilibrio di cariche elettriche presenti sulla superficie interna e quella esterna della membrana della cellula. La membrana cellulare presenta una ripartizione di cariche elettriche di segno diverso tra le due facce, tale membrana risulta quindi polarizzata, in essa sono presenti cariche elettriche negative all'interno e cariche positive verso l'esterno. Questa differenza di carica elettrica determina una differenza di potenziale di membrana a riposo, la membrana risulta quindi polarizzata. All'esterno della cellula è presente una maggiore quantità di ioni sodio (Na^+), mentre all'interno sono maggiori gli ioni potassio (K^+). Questa differenza di carica viene mantenuta grazie alla pompa sodio-potassio che trasporta attivamente gli ioni Na^+ al di fuori della membrana e ioni K^+ all'interno. Grazie a questi meccanismi all'interno della cellula si crea un gradiente di concentrazione attraverso la membrana con gli ioni K^+ che tendono a fuoriuscire dalla cellula e gli ioni Na^+ che vengono attirati verso l'interno. Dato che la membrana presenta una permeabilità molto maggiore al K^+ rispetto che al Na^+ , la pompa sodio-potassio deve lavorare molto per mantenere la giusta concentrazione degli ioni su entrambi i lati della membrana.

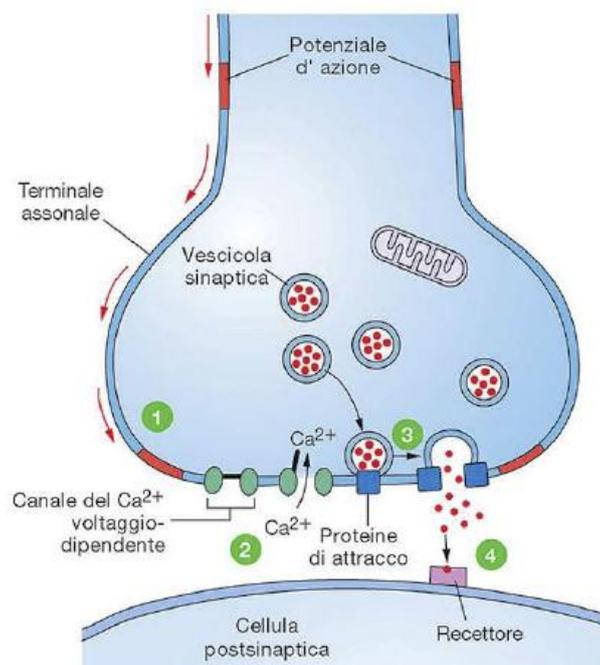


Figura 3.3_Fessura sinaptica.

La prima fase della trasmissione sinaptica consiste nella depolarizzazione del terminale assonale in conseguenza ad un potenziale d'azione. Successivamente la depolarizzazione apre i canali voltaggio-dipendenti per il Ca^+ e lo ione entra nella cellula. L'ingresso di

calcio provoca l'esocitosi del contenuto delle vescicole sinaptiche ed il neurotrasmettitore diffonde attraverso lo spazio sinaptico e si lega ai recettori sulla cellula post-sinaptica (figura 3.3).

Un ottimo esempio per comprendere il funzionamento di una sinapsi chimica è la *giunzione muscolare* che utilizza come neurotrasmettitore l'ACh, e per questo motivo viene chiamata colinergica. L'ACh viene liberata dalle vescicole sinaptiche attraverso la fessura sinaptica (100 nm) e va ad attivare i recettori postsinaptici (10.000 recettori/ μm^2). Il bottone sinaptico contiene molti mitocondri e un elevato numero di vescicole sinaptiche, al cui interno è accumulato il neurotrasmettitore ACh. La giunzione muscolare è una sinapsi chimica tra un *motoneurone spinale* e una *fibrocellula muscolare scheletrica* (figura 3.4). Quando l'assone del motoneurone entra in contatto con la membrana muscolare, si separa in numerose ramificazioni alle cui estremità si formano dei bottoni sinaptici. Questi bottoni terminano su una regione specializzata della fibrocellula muscolare, la *placca motrice*, dalla quale sono separati da una fessura di circa 100 nm. La membrana post-sinaptica della fibrocellula muscolare forma numerosi ripiegamenti, in corrispondenza dei bottoni post-sinaptici e nella parte terminale è presente un'elevata densità di recettori per ACh.

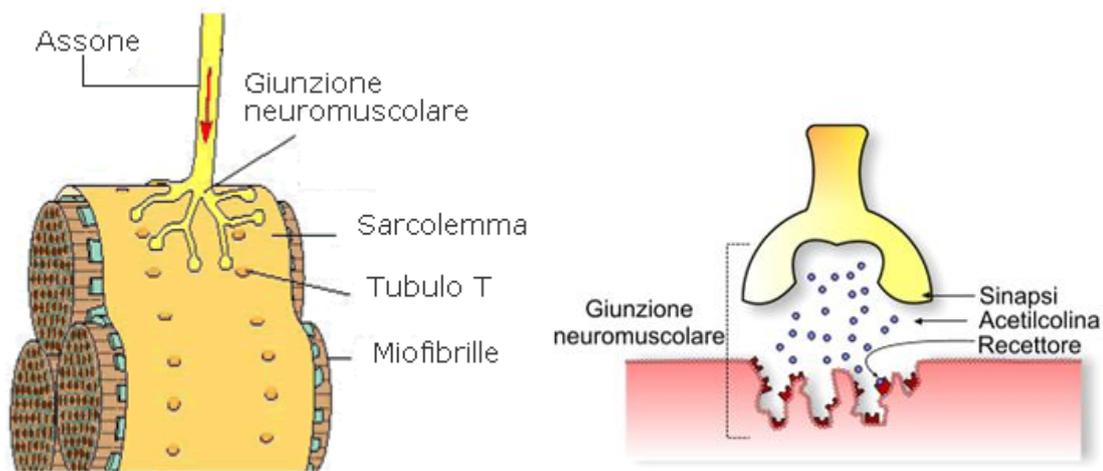


Figura 3.4_ Sinapsi chimica tra nervo e muscolo: giunzione neuromuscolare.

Considerando che nella sinapsi chimica un ruolo fondamentale è svolto dal Ca^{2+} , l'aumento di questo ione all'interno della terminazione favorisce la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana pre-sinaptica e avvia l'esocitosi del neurotrasmettitore. In relazione al tipo di risposta prodotta, i neurotrasmettitori si suddividono in *eccitatori* o *inibitori*, possono rispettivamente promuovere la creazione di un impulso nervoso nel neurone ricevente o inibirlo. Tra i neurotrasmettitori inibitori, più noti sono *l'acido*

gamma-aminobutirrico (GABA) e la *glicina*. Al contrario il *glutammato* rappresenta il più importante neurotrasmettitore eccitatorio del cervello.

Sulla base della dimensione invece, i neurotrasmettitori vengono distinti in *neuro peptidi* e *piccole molecole*. I neuropeptidi comprendono tra 3 e 36 amminoacidi mentre nel gruppo delle piccole molecole ci sono amminoacidi singoli, come il glutammato e il GABA, e i neurotrasmettitori come l'ACh, la serotonina e l'istamina. I due gruppi di neurotrasmettitori presentano anche modalità di sintesi e rilascio differenti. Farmaci, droghe e altre sostanze possono interferire con il funzionamento dei neurotrasmettitori. Molte sostanze stimolanti e anti-depressivi alterano la trasmissione dei neurotrasmettitori dopamina, norepinefrina (o noradrenalina) e epinefrina (o adrenalina), denominati nel complesso *catecolamine*.

Una sostanza può essere considerata neurotrasmettitore se possiede i seguenti requisiti:

- Deve essere contenuta nel neurone pre-sinaptico;
- Deve esistere un enzima chiave per la sua sintesi;
- Deve essere liberata in risposta ad una depolarizzazione Ca^{2+} dipendente;
- Devono essere presenti recettori specifici per la sostanza sulla membrana post-sinaptica;
- Deve esistere un enzima che la degrada o un meccanismo che l'allontana.

Molti neurotrasmettitori vengono rimossi dallo spazio tra le sinapsi da specifiche proteine, presenti nelle membrane dei neuroni e delle cellule della *glia*. Questo processo prende il nome di *ricaptazione*, in assenza di questo meccanismo i neurotrasmettitori potrebbero continuare a deprimere o stimolare il neurone post-sinaptico. Un altro meccanismo di rimozione dei neurotrasmettitori è la loro distruzione tramite un enzima; nel nostro caso l'enzima *acetilcolinesterasi* distrugge l'ACh. L'AChE è tra i neurotrasmettitori maggiormente presenti in natura, viene sintetizzata nella terminazione sinaptica a partire dall'*acetilcoenzima A* (CoA) e dalla *colina* in una reazione catalizzata dalla *colinaacetiltransferasi* (CAT). A livello delle giunzioni muscolari e altri distretti del sistema nervoso centrale l'ACh, produce un effetto eccitatorio, mentre nelle terminazioni postgangliari parasimpatiche esplica un effetto inibitorio.

3.2 STRUTTURA MOLECOLARE E MECCANISMO DI FUNZIONAMENTO DELL'ACHÉ

Il ruolo biologico principale dell'ACHÉ consiste nella terminazione della trasmissione delle sinapsi colinergiche tramite una rapida idrolisi del neurotrasmettitore ACh nella fessura sinaptica dopo che esso è rilasciato dal terminale nervoso presinaptico (Schweitzer et al. 1986). L'ACHÉ è una molecola proteica che si occupa di aumentare la velocità di reazione favorendo meccanismi molecolari, svolge quindi la funzione di catalizzatore. Questo enzima appartiene alla famiglia delle *idrolasi*, in quanto si occupa di catalizzare reazioni di idrolisi. Scendendo più nel dettaglio, l'ACHÉ è una *serina idrolasi*, una famiglia di enzimi molto eterogenea che solitamente svolge un ruolo funzionale su differenti tipi di esteri carbossilici, in genere presenti negli eucarioti superiori (Patocka et al. 2005). Il monomero AChE (figura 3.5) ha un peso molecolare di circa 60000 Da e si presenta come una molecola di struttura ellissoidale, la sua grandezza è approssimativamente 45 x 60 x 65 angstrom. La sua struttura consiste in 12 beta foglietti centrali circondati da 14 alfa-eliche (Sussman et al. 1991).

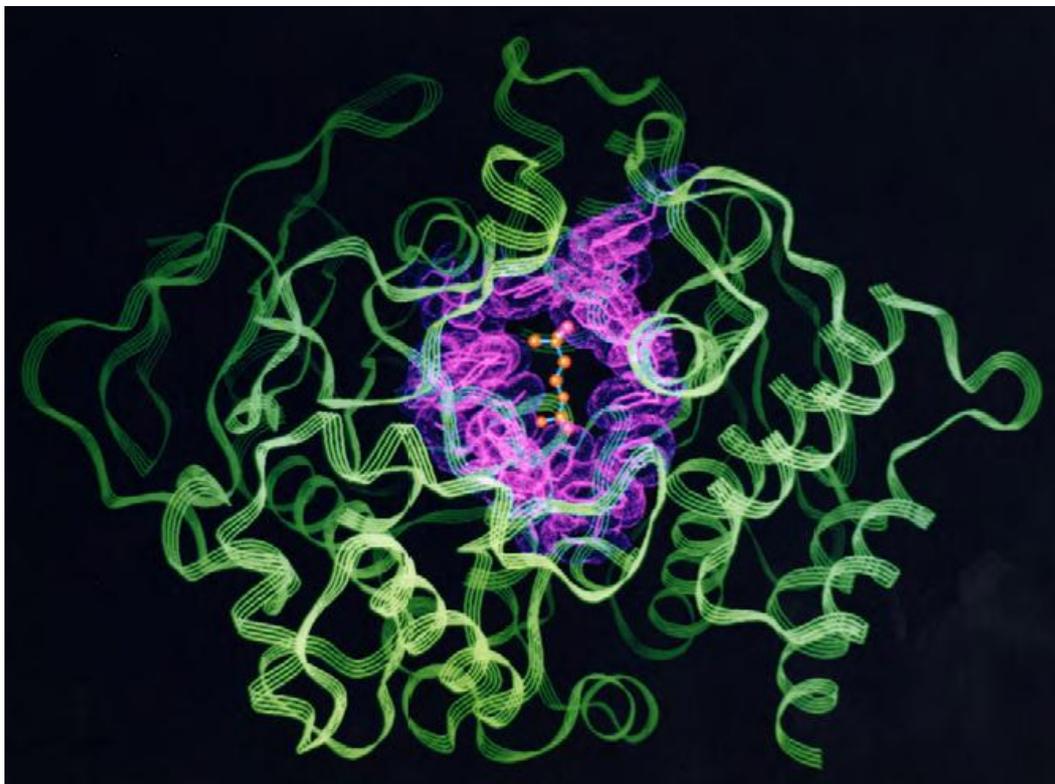


Figura 3.5_Structura 3D della AChE di Torpedo Californica (TcAChE) che mostra la posizione del sito attivo all'interno dell'enzima. i 14 residui aromatici conservati sono mostrati in colore rosa.

Ogni monomero contiene un centro catalitico composto da due compartimenti: il *subsito esterico* contenente la *triade catalitica* e il *subsito anionico*, il quale contiene il

compartimento quaternario carico positivamente dell'AChE. All'interno del subsito estericò è presente *triade catalitica* dell'enzima composto da Ser 200, His 440, e Glu 327, mentre il subsito anionico è composto da Trp 84, Phe 330, e Phe 331. La funzione principale del residuo Trp è quello di orientare la parte carica del substrato che entra nel sito attivo (Sussman et al.1991).

Lo studio della AChE ebbe inizio nel 1991, quando fu identificata la struttura cristallina dell'AChE in *Torpedo Californica*, e l'obbiettivo principale fu quello di cercare la relazione tra la funzione e le caratteristiche strutturali dell'enzima (Sussman 1991). Dai vari studi è emerso che è proprio la conformazione del suo sito attivo a rendere l'AChE così efficiente, il quale è collocato alla base di una profonda cavità all'interno della struttura (Silman and Sussman 2005). Questa cavità è denominata *gola aromatica* (figura 3.6) e si trova approssimativamente a 20 angstroms di profondità e penetra fino a mezza lunghezza dell'enzima; il suo rivestimento risulta per il 40% del composto da 14 residui aromatici posti nella cavità i quali sono altamente conservati in differenti specie di AChE (Harel et al.1993). I residui aromatici giocano chiaramente un ruolo importante nella stabilizzazione dei complessi.

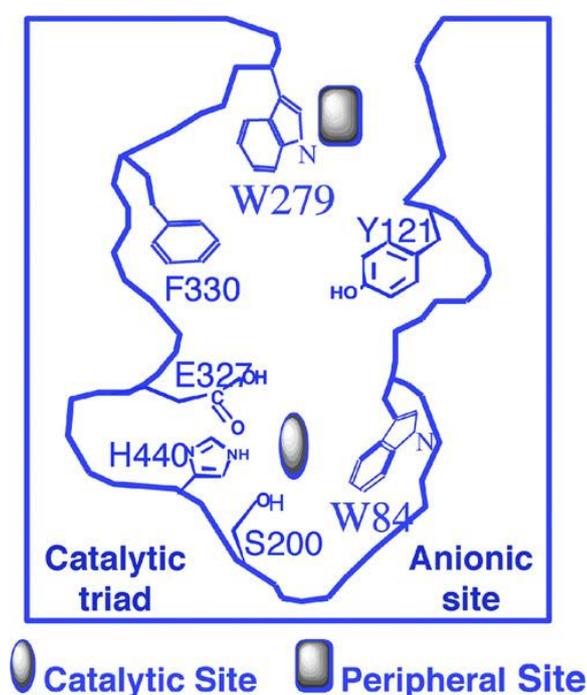


Figura 3.6_ Sezione schematizzata della *gola aromatica* della TcAChE.

L'AChE presenta un secondo sito anionico, denominato *peripheral anionic site* (PAS), il quale è collocato all'entrata della *gola aromatica*, che riveste il sito di legame ed interagisce con differenti attivatori ed inibitori. Quest'ultimo sito è composto da un cuore contenente residui Asp 74 e Trp 286. L'attacco di ligandi a questi residui può essere la chiave per la modulazione allosterica dell'attività catalitica dell'AChE (Bourne et al. 2003).

Nell'estremità opposta del sito attivo è presente una porzione nella quale gli elementi predominanti sono due residui di Phe288 e Phe290, denominata *acyl pocket*, all'interno della quale viene confinata la maggior parte dell'ACh. È importante sottolineare che l'idrolisi vera e propria avviene all'interno della triade catalitica, contenente gli elementi per mezzo dei quali si realizza l'interazione definitiva con il substrato. È in questa zona che l'ACh viene idrolizzata e quindi scissa in *colina e acetato*. Successivamente la colina viene recuperata nei distretti presinaptici, all'interno dei quali la CAT catalizza il processo inverso di sintesi dell'ACh (Silman and Sussman 2005).

Tra le principali osservazioni riguardanti la struttura dell'AChE, emerge la posizione del sito attivo, che come per molti altri enzimi rimane completamente nascosto, nonostante la sua funzione di interazione con il substrato. Secondo Silman e Sussman (2008) è proprio questa sua particolare conformazione a conferire all'AChE la capacità di interagire efficacemente con il substrato. Tali condizioni permettono all'ACh di essere completamente circondata dall'enzima e quindi consentono interazioni multiple tra substrato ed enzima.

L'interazione tra AChE e ACh, oltre ad essere condizionata dalle caratteristiche strutturali, è favorita anche dalla presenza di forze elettrostatiche di attrazione che interessa la carica positiva del substrato. L'AChE possiede un *momento di dipolo* molto grande orientato approssimativamente lungo l'asse del sito attivo. Una delle proprietà attribuita al momento di dipolo è quella di attirare il substrato carico positivamente all'interno del sito attivo (Silman e Sussman 2008). La mappa elettrostatica dell'AChE suggerisce che l'enzima, probabilmente come altri con substrato carico elettricamente, indirizza il substrato verso questa cavità e all'interno del sito attivo (Patocka et al. 2005). Un contributo importante alla formazione del dipolo deriva da una serie di residui acidi posizionati all'ingresso della gola aromatica (Shafferman et al. 1994).

3.2.1 Polimorfismo dell'AChE

Nei mammiferi l'AChE è codificata da un singolo gene, il quale possiede molti siti di inizio trascrizione, con pattern alternativi di *splicing* subito prima dell'esone di codifica. Questa condizione permette una scelta alternativa del sito accettore di *splicing* nella regione 3' del trascritto (Li et al. 19993; Atanasova et al. 1999). Vengono quindi generate proteine che hanno dominio catalitico identico composto da circa 500 amminoacidi, e che differiscono per la porzione *C-terminale*; un piccolo peptide costituito da meno 50 residui. A seconda della diversa scelta del sito accettore di *splicing*, può essere rimossa una parte più o meno estesa di pre-mRNA, per posizionare diverse sequenze in posizione codificante e determinare così differenti peptidi C-terminali (Massoulié 2008). Il pre-mRNA dell'AChE andando incontro a *splicing alternativo*, genera tre differenti trascritti (figura 3.7).

Scheme of alternative splicing, post-translational modifications and quaternary associations

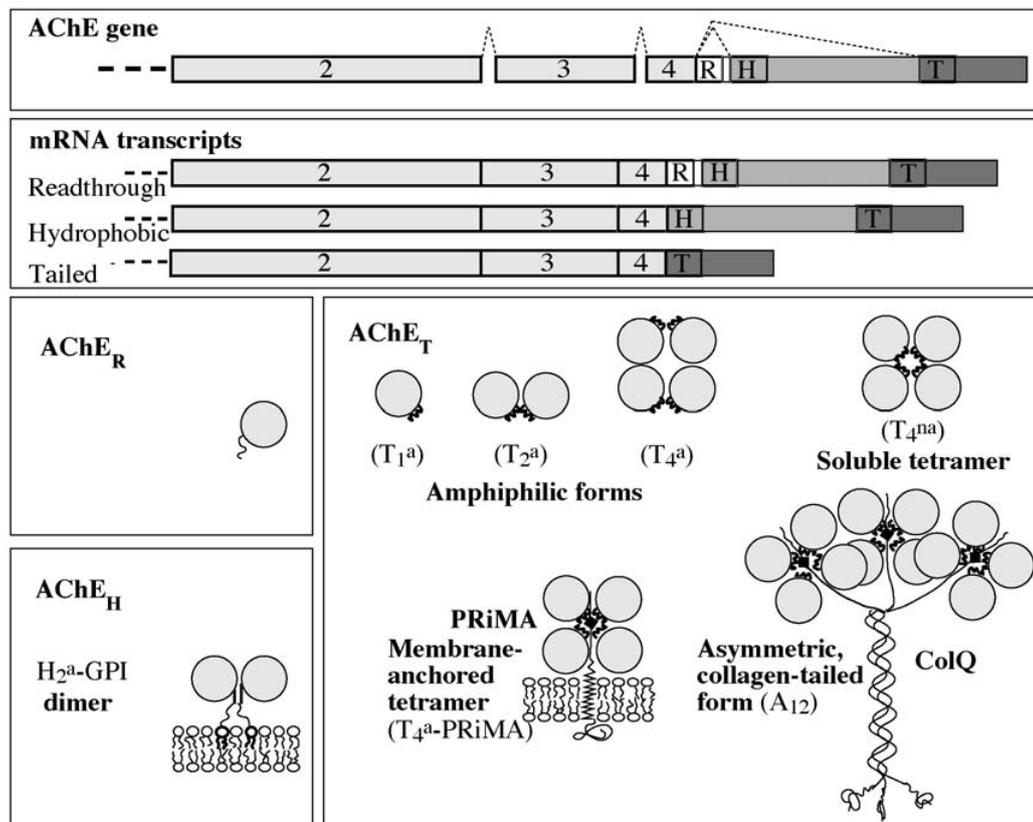


Figura 3.7_ Rappresentazione schematica della struttura del gene e delle forme molecolari dell'AChE in mammiferi.

Il principale trascritto nei tessuti dei muscoli e del cervello dà origine ad una isoforma di ACh_T chiamata **AChE_S**, derivante da ‘*synaptic form*’ o AChE_T, derivante da ‘*tailed form*’. Il trascritto *S* è presente in tutti i vertebrati, e al contrario degli altri trascritti, è stato osservato anche negli invertebrati. La traduzione di questo mRNA da origine nell’estensione *C-terminal* del centro (E2, E3, E4) tramite circa 40 residui amminoacidici, contenenti cisteina (Dan Grisaru et al.1999), i quali permettono alle subunità AChE di formare omo-oligomeri (principalmente dimeri e tetrameri), associati alle membrane per mezzo di proteine di ancoraggio: il collagene *Col Q* (Krejci et al 1991 e 1997), e la proteina trans membrana PRiMA (*Proline Rich Membrane Anchor*) (Perrier et al.2002). Nel primo caso, i tetrameri di AChE si congiungono ai filamenti di collagene ColQ, generando una forma molecolare ancorata alle membrane attraverso una coda di collagene: *collagen-tail forms*. Nel secondo caso, tetrameri si ancorano alla membrana legandosi al PRiMA, una proteina trans membrana ricca di proline. L’associazione tra le subunità catalitiche dell’AChE e le proteine di ancoraggio ColQ e PRiMA, prevede l’interazione tra il *C-terminale* e il PRAD (*Proline Rich Attachment Domain*), il quale consiste in un dominio di ancoraggio ricco di proline (Bon et al 1997). Nei mammiferi la variante ancorata mediante la coda di collagene ColQ gioca un ruolo fondamentale a livello della giunzione neuromuscolare (Feng et al 1999), mentre quella ancorata mediante PRiMA sembra essere la specie più presente a livello cerebrale (Perrier 2003).

La seconda specie più comune di trascritto è originata dalla trascrizione continua attraverso l’introne I4, per produrre il trascritto E1-E2-E3-E4-I4-E5-E6, e quindi per mancanza di *splicing* nella regione 3’ del gene. La traduzione di questo trascritto dà come risultato una estensione idrofila di 26 amminoacidi *C-terminal*, priva di cisteina; la proteina corrispondente è destinata perciò a rimanere monomericamente (Dan Grisaru et al.1999), viene indicata come **AChE_R** ‘*readthrough form*’ ed è espressa maggiormente in cellule embrionali e in cellule tumorali. Il trascritto *R* è stato caratterizzato in *Torpedo californica* e nei mammiferi e di solito è presente solo in quantità molto piccole. Aumenta in condizioni di avvelenamento da inibitori dell’AChE o in seguito a stress acuti in topi e stress termici in cellule in coltura (Massoulié et al. 2005). La presenza di questa forma in vivo è molto bassa e risulta inferiore del 2% dell’AChE totale attiva nel cervello (Perrier et al. 2005).

La terza opzione di *splicing* è il trascritto E1-E2-E3-E4-E5-E6, il quale può codificare nel *C-terminale* e viene scisso dopo l’amminoacido 14 del E5, ed è così collegato al *glicofosfatidilinositolo* (GPI). Quest’ultima forma prende il nome di **AChE_E** o AChE_H, e

deriva da *'erythrocytic form'* (Dan Grisaru et al.1999). Questa forma di ACh_E è stata ritrovata negli insetti, nei nematodi, negli anfibi protocordati e in alcuni vertebrati come in torpede e nei mammiferi. Il *trascritto E* esprime un peptide del C-terminale idrofobico caratterizzato dalla presenza di una regione per l'introduzione del GPI, attraverso il quale una forma dimerica dell'enzima si ancora alla membrana. In torpede questa isoforma ancorata attraverso GPI è stata ritrovata nel cervello, mentre nei mammiferi è presente sulla membrana degli eritrociti. Secondo alcuni studi l'ACh_E presente nelle membrane degli eritrociti gioca un ruolo fondamentale nell'idrolisi di qualsiasi molecola di ACh che entra all'interno del flusso sanguigno (Silver, 1974).

È importante sottolineare che le varie forme molecolari di AChE hanno dato sperimentalmente identiche proprietà catalitiche, mentre i loro ruoli biologici non sono necessariamente gli stessi (Dan Grisaru et al.1999).

3.2.2 Ruoli non colinergici dell'AChE

L'AChE, possiede un ruolo biologico che non rimane circoscritto alla sola trasmissione colinergica. La prima evidenza di funzioni addizionali per la proteina AChE si basa sulla presenza di alti livelli di AChE osservati in tessuti non neuronali come cellule sanguigne, in particolare eritrociti e megacariociti, dello sviluppo di cartilagine di uccelli, e sviluppo di oociti e spermatozoi (Malingier et al. 1989), nei quali il ruolo colinergico dell'AChE risulta poco probabile.

L'esistenza di un ruolo alternativo a quello colinergico all'interno del sistema nervoso, può essere dedotto anche dalla disparità tra distribuzione di AChE e CAT, che rappresenta un affidabile *marker* della neurotrasmissione colinergica, essendo l'enzima che sintetizza l'ACh (Mesulam e Geula, 1991). In certe regioni del cervello, dove sono presenti poche sinapsi colinergiche è possibile osservare bassi livelli di CAT e alti livelli di AChE. Dalla comparazione di questi due enzimi si può dimostrare che molti neuroni non colinergici contengono AChE (Levey et al. 1983). Inoltre attività di AChE sono state rilevate nel meningioma, astrocitoma, e glioblastoma, questo indica che l'AChE presenta una funzione all'interno dello spazio extracellulare con la superficie gliale o neuronale e questo influenza il comportamento nelle vicinanze di queste cellule, indipendentemente dalla neurotrasmissione colinergica (Dan Grisaru 1999). Secondo Layer e Weikert et al, l'AChE svolge un ruolo anche nella crescita dei neuriti, durante lo sviluppo (Layer 1991, Weikert et al. 1990).

Numerosi studi dimostrano che probabilmente l'AChE gioca un ruolo importante nello sviluppo della malattia dell'Alzheimer, una malattia cronica neurodegenerativa caratterizzata dalla perdita progressiva di neuroni colinergici. Un abbassamento dei livelli di AChE nel cervello è stato rilevato durante lo sviluppo di questa patologia, oltre che a una diminuzione dell'attività della *colina* (Peng Jing et al. 2008).

3.2.3 Risposta allo stress dell'AChE

L'insieme dei risultati degli studi che hanno preso in considerazione effetti sul cervello derivanti da stress acuti a livello fisiologico, mostrano l'AChE come una proteina che reagisce allo stress. In particolare l'isoforma AChE_R viene sovrapprodotta nella retina a seguito dell'azione di un agente stressore, tramite effetti metabolici e segnali di trasduzione che sono associati alle funzioni della fosfodiesterasi. Uno studio ha riportato che lo stress chimico indotto dall'esposizione del cervello a organofosfati provoca effetti nell'espressione transgenica dell'AChE nell'uomo, osservando la capacità dei neuroni di rispondere a fattori di stress esterni. Inoltre è stato osservato che la maggior parte dei neuroni produce AChE durante la fase dello sviluppo e non nell'organismo adulto proponendo un'azione dell'AChE nello sviluppo dei neuroni nei mammiferi (Dan Grisaru et al. 1999).

In uno studio del 2008 a seguito di trattamento con dbcAMP e forskolin, in colture cellulari PC12 è stato stimolato il sistema cAMP-dipendente, con conseguente effetto sull'espressione genica sia della proteina di membrana PRiMA che dell'AChE_T e dell'attività enzimatica di quest'ultima. In tale studio è stato riportato l'aumento dell'isoforma monometrica e tetramericca dell'AChE in cellule trattate con dbcAMP, indicando un'interazione con il legame della proteina di membrana PRiMA in cellule PC12, mediata da un meccanismo cAMP-dipendente (Choi et al.2008).

3.3 LINEA CELLULARE PC12

Gli esperimenti effettuati in questo lavoro di tesi si avvalgono di cellule in coltura, sulle quali sono stati studiati i possibili effetti dei campi elettromagnetici. Il sistema biologico scelto per questo studio è stato la linea cellulare PC12, la quale viene utilizzata come modello sperimentale per comprendere i meccanismi fisiologici, biochimici e molecolari, alla base dei processi degenerativi e delle cellule catecolaminergiche. Le cellule PC12 sono ritenute attualmente un valido sistema di previsione degli effetti indotti da un dato trattamento in vivo, nonostante alcune caratteristiche della loro fisiologia cellulare le diversifichino dalle cellule catecolaminergiche. Ad esempio il trattamento delle cellule PC12 con basse dosi di *L-DOPA* (agente antiparkinsoniano) produce morte cellulare, mentre alte dosi in vivo non producono danni cellulari (Falleni, 2002). Le cellule della linea PC12 derivano dal *feocromocitoma* di ratto, un tumore che si sviluppa dalle cellule cromaffini, situate principalmente nella midollare della ghiandola surrenale. Questa linea presenta caratteristiche tipiche di cellule cromaffino-simili, quali la sintesi, l'immagazzinamento e il rilascio di catecolammine, e caratteristiche delle cellule neuronali quali la capacità di rispondere alla stimolazione con fattore di crescita neuronale (*Nerve Growth Factor*, NGF) (Greene and Tischeler, 1976). Le catecolammine maggiormente interessate sono dopamina (DA) e norepinefrina (NE), la prima è un neurotrasmettitore del sistema nervoso centrale (SNC), mentre NE (o noradrenalina), è un neurotrasmettitore del sistema nervoso periferico (SNP). Questi neurotrasmettitori, tramite modificazioni fisiologiche generali, preparano il corpo ad una attività fisica e producono una reazione generale del SNC.

Le PC12 sono di dimensione relativamente piccole e variano da 5 a 10 μm , contengono una quantità limitata di citoplasma e hanno un tempo di moltiplicazione lungo, superiore ai 2 giorni (Spratt 1998). Quando sono mantenute nel loro terreno di coltura hanno un forma rotonda o poligonale e tendono a crescere in gruppo, in adesione, fino a 70 generazioni dal loro isolamento senza subire dei cambiamenti dal punto di vista genotipico e fenotipo (figura 3.8). Le PC12 sono in grado di sintetizzare e immagazzinare l'ACh, in modalità simili a quelle mostrate dai neuroni colinergici. Queste cellule sono in grado di prelevare la colina dal mezzo extracellulare, la quale viene utilizzata all'interno di esse come importante precursore per la sintesi di ACh (Melega et al. 1981). Tra gli aspetti più importanti delle PC12 c'è la capacità di rispondere all'NGF, una proteina che influenza la crescita e lo sviluppo dei neuroni. L'NGF agisce sulle cellule nervose, provocando la stimolazione della crescita di neuriti, l'aumento della dimensione delle cellule e l'induzione di alcuni enzimi implicati nella sintesi dei neurotrasmettitori. Inoltre il

trattamento con NGF sembra limitare la capacità delle cellule PC12 di replicarsi, infatti il processo di mitosi cessa in seguito all'azione di tale trattamento (Greene e Tischler 1976).

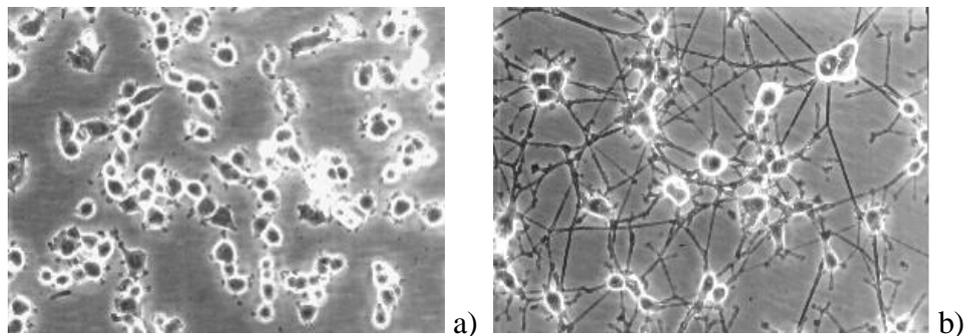


Figura 3.8 _Morfologia delle PC12 vista al microscopio a contrasto di fase. a) cellule indifferenziate ; b) cellule differenziate (Greene & Tischler, 1976).

4. SCOPO DELLA TESI

A seguito della crescente generazione e trasmissione di energia elettrica, con lo sviluppo di nuovi sistemi di telecomunicazione e con i progressi nelle applicazioni mediche e industriali, l'uomo è sempre più esposto a campi elettromagnetici. Sorge quindi la volontà di indagare sui potenziali effetti nocivi dei campi elettromagnetici, manifestatasi nel corso di diversi decenni di ricerca. Risultano di particolare interesse sanitario i campi elettromagnetici (EMF) prodotti dai telefoni cellulari, in quanto il loro utilizzo implica spesso il posizionamento dell'apparecchio in prossimità dell'orecchio, e quindi del cervello. Esperimenti in vivo su animali hanno affermato una correlazione tra modificazioni delle funzioni colinergiche ed esposizione a campi elettromagnetici, anche se le evidenze di queste relazioni non sono chiare. Complessivamente tali studi sono risultati coerenti nell'affermare che non ci sia correlazione fra EMF e cancro. Nonostante questo, recenti studi affermano che l'esposizione di roditori a campi microonde siano responsabili di rotture del filamento di DNA di tessuti testicolari e cerebrali (ICNIRP Review). Studi sull'EEG umano hanno affermato un cambiamento della fisiologia del cervello in seguito ad esposizione a RF-EMF a modulazione di frequenza (Hurber et al. 2005). Nel 2011 l'agenzia internazionale dell'OMS per la ricerca sul cancro (IARC), ha classificato gli EMF come "*possibilmente cancerogeni*", in quanto l'evidenza epidemiologica è stata giudicata "limitata". Successivamente l'OMS si è espressa in favore di ulteriori ricerche giustificate dal crescente utilizzo di telefoni cellulari, mentre non è stata richiesta l'adozione di misure precauzionali di limitazione delle esposizioni connesse all'utilizzo di telefoni cellulari. Emerge dunque la necessità di proseguire gli studi, che con questa tesi abbiamo indirizzato all'enzima acetilcolinesterasi (AChE). Lo studio dell'attività dell'AChE presenta una rilevante importanza dal punto di vista sanitario considerando che il deterioramento progressivo delle cellule neuronali, riscontrato nel Morbo di Alzheimer, è attribuito ad una diminuzione del livello di neurotrasmettitore ACh (Lane et al. 2005). A partire dagli anni 80, sono stati svolti studi dell'attività dell'enzima AChE a seguito di esposizioni a EMF, i quali hanno evidenziato nella maggior parte dei casi un cambiamento dell'attività stessa. Lo studio della correlazione tra AChE e EMF ad alta frequenza (HF-EMF) potrebbe essere una via per avvicinarci alla determinazione della presenza o dell'assenza di effetti derivanti dall'utilizzo dei telefoni cellulari sulla salute umana, in quanto l'AChE svolge un ruolo importante nella trasmissione sinaptica. Questo enzima catalizza infatti l'idrolisi dell'ACh, molecola coinvolta nella neurotrasmissione del

segnale nel sistema nervoso umano e animale. Il presente lavoro, si avvale di un valido sistema di irraggiamento ad alta frequenza che simula l'esposizione ai segnali GSM; lo studio è stato svolto sulla linea cellulare PC12, cellule tumorali derivanti da feocromocitoma di ratto capaci di secernere e immagazzinare ACh e AChE. Sono state valutate in particolare l'espressione genica e l'espressione proteica dell'AChE nelle cellule PC12 esposte ad una frequenza portante di 1,8 GHz con frequenza di modulazione di 217 Hz, condizioni alle quali lavorano comunemente gli apparati di telefonia mobile in modalità GSM.

5. MATERIALI E METODI

SPERIMENTALI

5.1 COLTURE CELLULARI

Le colture cellulari si basano sull'impiego di cellule che si moltiplicano *in vitro*, per una o più generazioni, dopo aver perso la struttura del tessuto e aver subito generalmente un certo grado di differenziazione. A partire da un organo o da suoi frammenti, è possibile ottenere una sospensione cellulare utilizzando in maniera combinata supporti meccanici e mezzi chimici. La sospensione ottenuta in questo modo, viene posta in un contenitore di vetro o di plastica, a fondo piatto (piastra Petri, fiasca, ecc.) con un terreno liquido, che contiene gli ioni necessari ad una concentrazione isosmotica, diversi amminoacidi e vitamine, ed un siero animale in proporzione variabile. In questo studio gli esperimenti si sono serviti della linea cellulare PC12, il *mezzo di coltura* utilizzato è stato il D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*); si tratta di un mezzo ad alto contenuto di glucosio, arricchito con:

- 10% di siero di cavallo;
- 5% di siero fetale bovino;
- 1% di una miscela di antibiotici (penicillina-streptomicina).

Le cellule devono essere mantenute a condizioni ambientali costanti a 37°C, 5% di CO₂, e ad una umidità del 95%, per mezzo di un incubatore (*THERMO electron corporation*).

Per il *mantenimento della linea cellulare*, le cellule vengono fatte crescere nel *mezzo di coltura* in adesione sul fondo delle fiasche trattato chimicamente per favorire il legame con le proteine di adesione cellulare presenti nel siero. Prima del raggiungimento della *confluenza*, cioè la formazione di un monostrato che ricopre l'intera superficie di adesione, è necessario staccarle tramite un'operazione di tripsinizzazione e seminarle nuovamente dopo averle opportunamente diluite. La tripsinizzazione consiste nel provocare la lisi delle proteine della matrice che mantiene le cellule aderenti, rompendo i legami tra le singole cellule e quelli che si formano tra la cellula e la parete trattata della fiasca, grazie all'utilizzo di un enzima: la tripsina.

Le principali operazioni per l'uso delle colture cellulari sono:

- _ Congelamento delle cellule;
- _ Scongelo delle cellule;

- _ Mantenimento delle cellule;
- _ Semina delle cellule.

L'allestimento e il mantenimento della linea cellulare, prevedono una serie di operazioni, che viene svolta rigorosamente sotto cappa biologica a flusso laminare in condizioni di sterilità. La cappa utilizzata è del tipo *Steril VBH MP/99*.

Semina delle cellule per esperimenti

La semina delle cellule consiste nel porre un'adeguata quantità di sospensione cellulare, ottenuta tramite tripsinizzazione e dalla successiva diluizione in mezzo completo, nel supporto utilizzato per eseguire i trattamenti sperimentali; piastre Petri $\Phi = 35$ mm per gli esperimenti di irraggiamento o piastre a 6 pozzetti per i trattamenti con fsk, dbcAMP e stress termico (figura 5.1). Dopo il trattamento con l'enzima tripsina, aver centrifugato e risospeso il pellet in 5 mL di *mezzo di coltura*, si calcola quanto volume di sospensione cellulare bisogna utilizzare per ogni pozzetto, a seconda del giorno prefissato per l'esperimento, e quindi del tempo che hanno le cellule per raggiungere la semiconfluenza. Successivamente si prepara la miscela costituita da sospensione cellulare e mezzo completo in relazione al numero di piastre da seminare e si dispensano 2 mL di questa soluzione in ogni Petri. Infine si aggiunge 1 mL di mezzo completo a ogni piastra, a questo punto le cellule vengono lasciate crescere in incubatore per poi essere esposte ai trattamenti sperimentali. Prima dell'inizio degli esperimenti alle cellule viene aspirato il mezzo di coltura e sostituito con mezzo base (DMEM senza aggiunta di sieri, né di antibiotici), per evitare che nel corso degli esperimenti, che durano dalle 6 alle 48 ore, le cellule continuino a duplicarsi attivamente.



Figura 5.2_Semina delle cellule per gli esperimenti.

5.2 SISTEMA D'IRRAGGIAMENTO

Gli esperimenti effettuati in questo lavoro si basano sul confronto di campioni di cellule irraggiate e campioni di controllo. Per simulare il campo elettromagnetico generato dall'uso di un telefonino GSM è stato utilizzato un sistema di esposizione realizzato dall'IT'S-Foundation (*Foundation for Information Technologies in Society*) con sede a Zurigo. L'irraggiatore è costituito principalmente da:

- **Due guide d'onda** (*waveguide*) inserite nell'incubatore e comunicanti con l'esterno grazie ad una ventola che garantisce un flusso di aria che consente un'omogeneità di condizioni di calore, ossigeno e anidride carbonica. Le guide sono di materiale metallico placcate in oro sulla superficie interna, questo perché esso rappresenta un buon conduttore e facilita quindi, lo spostamento delle cariche nella guida d'onda;
- **Un'antenna** per l'emissione delle onde elettromagnetiche all'interno di ogni guida;
- **Una sonda** per rilevare l'intensità di **campo elettromagnetico (EMF)** all'interno di ogni guida, in modo che il computer possa rilevare la frequenza esatta che mette in risonanza la guida;
- **Una sonda** per rilevare la **temperatura** all'interno di ogni guida, posizionata nel condotto di areazione che mette in contatto la guida stessa con l'esterno.

Alla sorgente di onde elettromagnetiche, posizionata all'interno di ciascuna *guida d'onda*, viene applicata, tramite un generatore, una d.d.p. con frequenza pari a 1,8 GHz. Questa frequenza (ω) è in grado di creare un momento di dipolo, dovuto allo spostamento delle cariche presenti su di essa. Il momento di dipolo così creato, varia nel tempo secondo questa equazione:

$$V = V_0 \cos(\omega t)$$

Il dipolo varia con il tempo in questo modo:

- Se $t = 0$ allora il dipolo presenta un massimo positivo;
- Se t rende vera l'equazione $\omega t = \pi/2$, allora t diventa 0;
- Se t rende vera l'equazione $\omega t = \pi$, allora t diventa un minimo di segno negativo;
- Quando $\omega t = 3/2\pi$, t avrà valore di 0.

La durata di questo ciclo, che determina la frequenza del campo elettromagnetico generato all'interno delle *guide d'onda*, è pari a 0,546 ns. All'interno delle guide d'onda viene generato un campo statico, in quanto il campo elettrico si annulla alle pareti di esse, come conseguenza della riflessione prodotta da onde perpendicolari incidenti sulle pareti.

Prima dell'irraggiamento, le piastre Petri contenenti le cellule, vengono posizionate all'interno delle *guide d'onda* grazie all'ausilio di un supporto in plastica. Le Petri presentano un diametro di 35 mm e vengono sistemate in due file una sull'altra, in modo di essere posizionate nelle 3 zone centrali in cui il campo elettrico è zero ed il campo magnetico è massimo. All'interno di queste 3 zone il campo magnetico oscilla in modo perpendicolare alle pareti, e in direzione tangente rispetto alla posizione delle Petri.

Le cellule contenute all'interno delle Petri, sono immerse in un mezzo di coltura che presenta un'elevata conducibilità, per questo il campo magnetico che le attraversa dà origine ad un campo elettrico con direzione perpendicolare ad esso, che ruota in senso antiorario partendo dal fondo della Petri e sale fino alla superficie del mezzo per poi riscendere verso il fondo. La presenza di questo campo elettrico indotto influisce sul meccanismo di selezione della frequenza portante a cui impostare l'irraggiatore. Il sistema di esposizione in questione opera una scansione di tutte le frequenze per selezionare quella idonea per fare entrare in risonanza la *guida d'onda*. In presenza di un mezzo conduttore al suo interno, l'antenna emette a varie frequenze, tutte intorno a 1,8 GHz, poi attraversando la sonda elettromagnetica, che rivela l'intensità di campo, viene stabilita la frequenza ideale. La guida d'onda può essere messa in risonanza da più di una frequenza, che dipende dalle dimensioni della guida d'onda stessa. Per i nostri parametri la frequenza utilizzata è quella di 1,824 GHz. Come conseguenza si ha che otteniamo un EMF in cui ad un massimo di campo elettrico corrisponde un massimo di campo magnetico, riproducendo i segnali generati dalle antenne.

L'irraggiatore è collegato ad un software, che permette di impostare i parametri dell'esperimento, tra i quali abbiamo il SAR (tasso di assorbimento specifico, misurato in W/kg di massa biologica) al quale si vogliono esporre le cellule, nel presente lavoro è stato scelto un valore di 2 W/kg. Questo parametro si presenta di rilevante importanza, dato che è strettamente legato ad una serie di fattori che devono essere presi in considerazione con attenzione:

- Valori di campo magnetico: il SAR dipende dal quadrato dell'intensità del campo magnetico, il quale deve essere il più possibile omogeneo all'interno delle piastre Petri;
- Mezzo di coltura: Un diverso volume del mezzo di coltura all'interno delle Petri, modifica l'area della superficie di mezzo che intrinseca perpendicolarmente il campo magnetico, portando ad una maggiore, o minore induzione del campo elettrico, a seconda che il mezzo aumenti o diminuisca. Il campo elettrico è

direttamente legato al SAR. Inoltre i valori di densità e conducibilità del mezzo di coltura influenzano il valore di SAR realmente assorbito dalle cellule;

- Altezza del menisco: il menisco che si crea all'interno di un mezzo liquido contenuto all'interno di una Petri, produce un effetto di aumento della superficie del mezzo di coltura in grado di intercettare il campo magnetico, con conseguente aumento del flusso dello stesso, aumento di energia che attraversa il mezzo acquoso, e quindi del SAR. Per evitare che il menisco vari durante la sostituzione del mezzo di coltura completo con il mezzo base (DMEM senza aggiunta di sieri, né di antibiotici), e che rimanga stabile all'altezza minima al momento dell'irraggiamento, è necessario aggiungere 4 mL di mezzo base per poi sottrarne 1, per fare sì che la parete della Petri venga inumidita. Questo perché il menisco si forma a seguito del fatto che le forze di coesione tra particelle acquose, sono di minore entità rispetto alle forze di coesione sviluppate tra particelle acquose e le pareti delle Petri, quindi inumidendo le pareti, è possibile ottenere un menisco più basso e stabile.
- Omogeneità del campo elettromagnetico: All'interno delle *guide d'onda* l'intensità del campo magnetico si presenta disomogenea e varia anche la sua interazione con le infinite sezioni delle Petri, in quanto ognuna di esse ha un'area diversa dall'altra. Le aree delle sezioni infatti, diminuiscono dal centro verso bordo, determinando quindi una diversa entità di campo elettromagnetico che genera una disomogeneità del valore di SAR sul fondo della capsula. Tale disomogeneità viene valutata in decibel (dB) e viene considerato che ad ogni incremento o diminuzione del SAR pari a 3 dB, corrisponde un raddoppio o un dimezzamento del tasso di assorbimento specifico stesso.

Modalità d'irraggiamento

L'irraggiamento delle cellule è stato effettuato impostando il *software* unicamente nella modalità **217 Hz amplitude modulation** (GSM-217Hz), con questa modulazione ad impulso viene simulato il TMDA (*Time Division Multiple Access*), il quale consiste nella suddivisione in slot temporali caratteristica dei segnali GSM. Ognuno di questi *frame* della durata di 4,608 ms, viene suddiviso in 8 slot temporali e solo in uno di questi avviene l'emissione del segnale. Come conseguenza dell'emissione di energia concentrata in determinati intervalli temporali, abbiamo che il SAR assume valori di picco 8 volte maggiori di quelli normali. Un'altra conseguenza di questa emissione ad intervalli è una

modulazione di impulso equivalente ad una modulazione di ampiezza a diverse onde di frequenza multipla di 217 Hz. Questo genera una sommatoria di onde che dà origine a onde quadrate. Tutti gli esperimenti sono effettuati con esposizione intermittente (5 minuti *on* 10 minuti *off*), per simulare più fedelmente le condizioni legate all'impiego del telefono cellulare, che nell'arco di 24 ore non è continuativo.

Tutti gli esperimenti prevedono un'esposizione delle cellule ai campi della durata di 24 h; la scelta di questa durata di esposizione deriva dall'osservazione dei risultati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio, dove gli effetti degli EMF erano evidenti su differenti parametri (espressione genica delle HSP70 o danni al DNA rilevati con il COMET assay) dopo 24 h di esposizione (Franzellitti et al 2008, Franzellitti et al 2010).

Ogni esperimento prevede l'inserimento di 6 piastre Petri per ogni *waveguide*, il computer decide automaticamente in quale guida d'onda generare il campo elettromagnetico, e quale adibire a controllo (*sham*). In questo modo viene garantita la presenza di un campione di controllo non irraggiato, sottoposto alle stesse condizioni del campione irraggiato. Questo sistema permette di svolgere esperimenti in *cieco*, in quanto la guida da irraggiare viene scelta casualmente dal computer e tale informazione non viene resa nota all'operatore durante le analisi. Dopo l'irraggiamento i file devono essere inviati all'ETH di Zurigo che grazie ai modelli di simulazione dell'esperimento esegue una decriptazione dei log file che si basano su parametri concordati (es. composizione chimica del mezzo utilizzato negli esperimenti). In questo modo l'operatore ottiene le informazioni su campioni irraggiati e controlli solo dopo avere ottenuto i dati sperimentali, eliminando una soggettività che può in qualche misura, influire sulla valutazione dei risultati. E' ampiamente dimostrato che le convinzioni, i preconcetti, le aspettative, o semplicemente determinate informazioni che lo sperimentatore possiede possano indurlo a un involontario fraintendimento dei dati osservati. Oltre allo sham, per ogni esperimento viene preparato un ulteriore controllo, costituito da cellule mantenute in un diverso incubatore, che deve servire a verificare che i risultati ottenuti dallo sham siano effettivamente paragonabili a quelli del controllo esterno.

5.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA

5.3.1 Estrazione proteine

La preparazione del campione per il saggio enzimatico consiste nell'estrazione del materiale proteico presente nelle cellule mediante l'utilizzo di *NP40 (Tergitol-type)* all'1% in PBS (tampone fosfato salino).

Il mezzo base presente nei campioni sperimentali, viene prelevato e scartato con l'ausilio di pipette Pasteur di plastica. Dopo di che ciascun pozzetto viene lavato con 1 ml di PBS freddo (4°C), segue l'eliminazione di questo e l'aggiunta di un altro ml di PBS freddo. A questo punto le cellule vengono staccate dal fondo di ogni Petri con l'ausilio di uno *scrapper* (raschietto) in plastica e il contenuto viene raccolto con una pipetta e messo in provette da 1,5 ml. Segue una centrifugazione alla velocità di 800 *xg* a 4°C per 10 minuti, dopo di che il surnatante viene eliminato e il *pellet* risospeso in una *soluzione di lisi* (50 µL/pozzetto) contenente il detergente NP40 all'1% in tampone fosfato pH 7.2 10 mM. Le cellule saranno lasciate lisare in NP40 per 1h a 4°C, e centrifugate per 10 minuti a 3000 *xg*, sempre a 4°C. Ora il surnatante viene travasato in una nuova provetta. A questo punto una parte del campione deve essere conservato per la determinazione della concentrazione proteica tramite il **saggio di Lowry** e il resto verrà utilizzato per il **saggio enzimatico**. Il primo richiede una diluizione delle cellule in NaOH 1 N, vengono quindi prelevati 20 µL di campione e messi in 60 µL di NaOH (diluizione di 4 volte) per denaturare le proteine, mentre il campione rimanente viene conservato a - 80°C fino al saggio enzimatico.

5.3.2 Quantificazione proteica

Il saggio di Lowry é un saggio colorimetrico per valutare la concentrazione delle proteine in un campione biologico e si basa sulla reazione del reagente di Folin Ciocalteue con i legami peptidici di alcuni amminoacidi (tirosina, cisteina e triptofano). La micropiastra va riempita inserendo inizialmente 90 µL di acqua distillata nei pozzetti destinati alla prova in bianco e in quelli dove verranno inseriti i campioni sperimentali, mentre nei pozzetti riservati allo standard viene inserita una quantità di 50 µL dell'opportuna diluizione. Successivamente vengono aggiunte le 5 soluzioni standard precedentemente preparate a partire da un'aliquota madre 0,5 mg/mL, costituita da una proteina nota: l'*albumina bovina sierica* (BSA, Sigma). Da questa si effettuano delle diluizioni per ottenere rispettivamente una quantità di albumina per ogni pozzetto di 10 µg, 7,5 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1 µg. La

funzione di questi standard noti consiste nel correlare le misure di assorbanza effettuate con lo spettrofotometro ad una serie di concentrazioni note, in modo da poter ottenere una retta di taratura, che permetta di ricavare dall'assorbanza la concentrazione di proteine nei campioni sperimentali.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	St1	St2	St3	St4	St5	1	2	3	4	5	6
B	B	St1	St2	St3	St4	St5	1	2	3	4	5	6
C	B	St1	St2	St3	St4	St5	1	2	3	4	5	6
D	B	St1	St2	St3	St4	St5	1	2	3	4	5	6
E	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
F	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
G	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
H	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18

Figura 5.2_ Schema di caricamento su micro piastra, B= bianco, St= standard, 1,2, n=campioni in quadruplicato.

Il prossimo passaggio richiede l'aggiunta di 10 μL di NaOH 1N, in ogni pozzetto riservato al bianco e agli standard. Questi passaggi consistono nell'immissione di ripetute quantità di reagenti nei pozzetti, per questo è consigliabile utilizzare una multi pipetta per agevolare l'operazione, ridurre i tempi e garantire la precisione della manovra; in fine viene aggiunto il campione sperimentale. Lo schema sperimentale adoperato, come è possibile osservare in figura 5.2, è caratterizzato da una analisi dei campioni in quadruplicato, con un numero massimo di 18 campioni analizzabili per volta. L'analisi avviene inserendo la micro piastra all'interno di un lettore micro piastre *EL 808 BioTek*, segue l'aggiunta di 200 μL di soluzione A+B per ogni pozzetto. Tale soluzione viene preparata con 22 mL di soluzione A (Na^+ , K^+ -tartraton 20%, Na_2CO_3 2%, e NaOH 0.4%), ai quali si aggiungono 220 μL di soluzione B (CuSO_4), e viene fatta reagire con il campione sperimentale per 10 minuti. Gli ioni Cu^+ presenti nella soluzione B reagiscono in ambiente basico con i gruppi CO-NH_2 delle proteine, dando una colorazione violetta. Dopo 10 minuti vengono aggiunti 20 μL di soluzione C (reagente di Folin e H_2O in rapporto 1:1) ad ogni pozzetto; in questa seconda fase, il complesso Cu-proteine riduce gli acidi fosfotungstenico e fosfomolibdenico contenuti nel reattivo di Folin a blu di tungsteno e blu di molibdeno. Le letture di assorbanza vengono effettuate dopo 30 minuti alla lunghezza d'onda di 650 nm, dopo di che viene costruita la retta di taratura con i campioni standard, ed utilizzando i parametri di questa retta è possibile risalire alla concentrazione di proteine del nostro campione mediante l'equazione:

$$y = ax + b$$

Dove:

- y è il valore di assorbanza registrato dal lettore;
- a e b sono i parametri derivanti dalla retta degli standard;
- x è la concentrazione delle proteine d'interesse.

Il valore di concentrazione proteica così ottenuto, sarà utilizzato per calcolare la quantità di campione che verrà impiegato nel saggio enzimatico.

5.3.3 Saggio enzimatico

Il saggio si basa sull'uso del reagente di Ellman (acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico, DTNB), un composto chimico impiegato per la misura della quantità dei gruppi tiolici. Il composto reagisce in questo caso con la tiocolina prodotta in seguito all'azione enzimatica dell'AChE su substrato acetiltiocolina (ASCh), e rilascia nitro benzoato (TNB), riconoscibile da un forte colore giallo. La reazione è rapida e stechiometrica: una mole di tiolo produce il rilascio di una mole di TNB, che viene in fine quantificato impiegando lo spettrofotometro Beckman Culter DU 800, impostando una lunghezza d'onda di 405 nm, e utilizzando il coefficiente di estinzione di $14140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Prima di iniziare il saggio si effettua il graduale scongelamento dei campioni conservati fino a questo momento alla temperatura di -80°C , posizionando le provette in ghiaccio in modo da mantenere attivo l'enzima, e si mette a riscaldare il Tampone Fosfato a 30°C . In seguito si prepara la soluzione di DTNB per ottenere una soluzione di 8 mM, e si copre con carta stagnola perché il colorante è sensibile alla luce. Le condizioni sperimentali per il saggio enzimatico sono:

- tampone fosfato 0,1 M a pH 7,4;
- DTNB 0,3 mM;
- acetiltiocolina 0,5 mM;
- omogenato proteico 0,05 mg/ml;
- volume finale 1.2 ml, 30°C per 5 minuti.

In ogni cuvetta verranno messi:

- 50 μL di DTNB 8 mM;
- 50 μL di ASCh 12 mM;
- Un volume opportuno di campione calcolato mediante Lowry, per prelevare 0,06 mg di proteina;
- Tampone fosfato nella rimanente parte, per arrivare a 1,2 mL.

Prima di effettuare l'analisi, si imposta la lettura dello spettrofotometro a 405 nm per 5 minuti. Dopo aver ottenuto le misure di assorbanza mediante spettrofotometro si risale alla concentrazione di ASCh idrolizzata, quindi alle unità di AChE, mediante la relazione di Lambert-Beer e dividendo per il tempo e i mg di proteina. L'attività dell'enzima è espressa come nanomoli di prodotto-per mg di proteina per minuto:

Legge di *Lambert-Beer*

$$A = e \times b \times c$$

Dove:

- _ A è l'assorbanza misurata dallo spettrofotometro;
- _ e è il coefficiente di estinzione specifico per la molecola da quantificare;
- _ b è il cammino ottico (pari a 1 cm);
- _ c è la concentrazione della molecola di interesse, in questo caso molecole di tiolo.

Cinetica enzimatica

L'attività enzimatica dell'AChE è stata caratterizzata anche valutando le costanti cinetiche V_{\max} e K_M . Infatti l'AChE promuove processi di catalisi enzimatica in cui la velocità della reazione dipende esclusivamente dalla quantità di substrato. Questa reazione si sviluppa con una cinetica che va a saturazione quando il sito attivo viene occupato interamente dal substrato, quindi anche al crescere della concentrazione di substrato la velocità di reazione non può aumentare oltre un certo limite (figura 5.3). Questa tipologia di reazione presenta una cinetica che può essere rappresentata dall'equazione secondo la quale la velocità di reazione è:

Equazione di Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

Il modello cinetico illustra come a seguito di un aumento anche minimo, della concentrazione del substrato disponibile all'enzima, la velocità della reazione aumenti notevolmente fino al raggiungimento di un massimo, chiamato V_{\max} , che corrisponde alla velocità di reazione massima ottenibile, quando tutto l'enzima viene utilizzato nella reazione. In questo punto la reazione ha raggiunto la velocità massima possibile, dato che il substrato è presente in quantità da saturare tutto l'enzima presente in soluzione. La K_M , rappresenta la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione abbia velocità pari alla metà della velocità massima, esprime quindi l'affinità dell'enzima per il substrato, in quanto maggiore è il valore di K_M , minore è l'affinità e viceversa.

Lo stesso protocollo utilizzato per il saggio enzimatico, viene utilizzato per valutare la cinetica enzimatica, impiegando 10 diverse concentrazioni di substrato che variano da 0,01 a 3 mM. Le costanti cinetiche sono state ricavate interpolando i dati sperimentali con l'equazione di Michaelis-Menten, utilizzando il programma *Sigma Plot* (Versione 9.00 SPSS Science, Jandel Scientific).

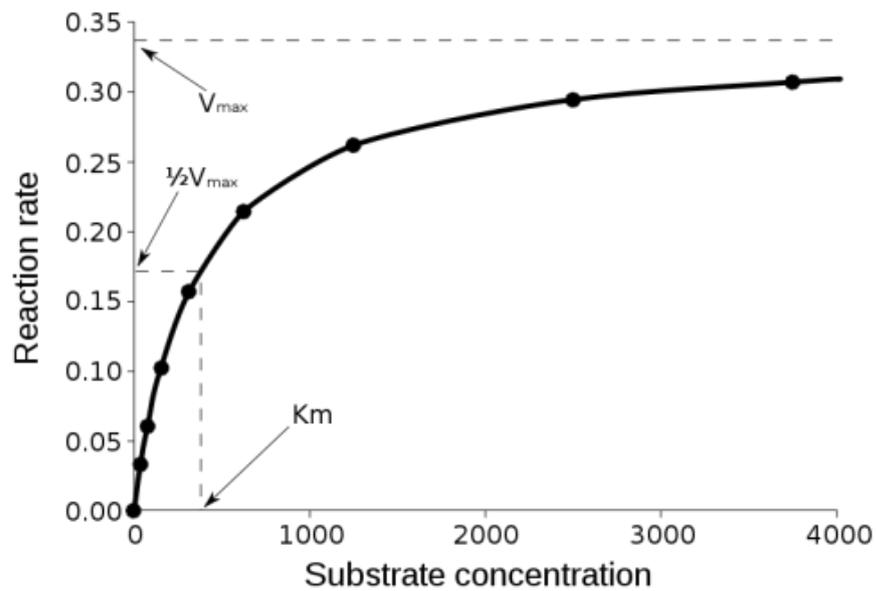


Figura 5.3_ Grafico velocità/concentrazione che mostra la cinetica a saturazione tipica di una reazione enzimatica.

5.4 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'analisi dell'espressione genica effettuata in questo lavoro di tesi è stata articolata nelle fasi mostrate nel grafico sottostante:

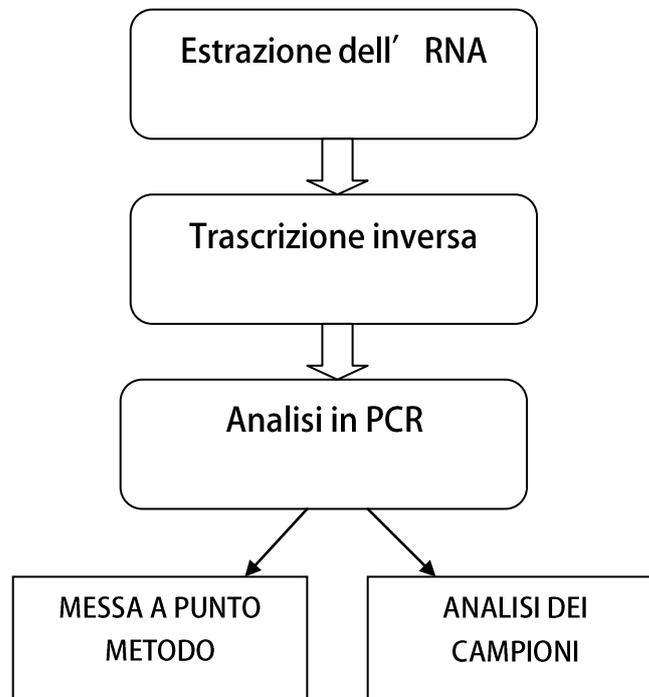


Figura 5.4_Fasi di analisi dell'espressione genica.

5.4.1 Estrazione dell'RNA totale

Un punto critico del maneggiare RNA è evitare la presenza di RNasi nelle proprie soluzioni e nel materiale di laboratorio. Per questo motivo abbiamo usato reagenti privi di RNasi, abbiamo autoclavato il materiale, e impiegato acqua trattata con *dietil pirocarbonato* (DEPC) e puntali con filtro per pipette.

Procedimento

Il metodo di estrazione eseguito prevede l'utilizzo del kit Charge Switch (invitrogen), in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Questo metodo prevede 5 fasi principali:

1. *Preparazione del lisato cellulare*: le cellule, dopo il trattamento sperimentale vengono private del mezzo di coltura, lavate con 1 mL di PBS freddo e quindi lisate dopo l'aggiunta di 0,5 mL/pozzetto di tampone di lisi, contenente *proteinasi k*. Dopo averle trasferite in *ependorf* sono poste a 60°C per 15 minuti;

2. *Attacco dell'RNA*: questa fase si basa sull'azione elettrostatica di particelle magnetiche che si legano agli acidi nucleici presenti nel campione. Le provette vengono inserite all'interno del *MagnaRack*, un apposito porta provette costituito da una postazione magnetica e una normale. Spostando le provette nella postazione magnetica le particelle magnetiche legate alle molecole di acidi nucleici formano un pellet in prossimità dei magneti, che ci permette di eseguire lavaggi rapidi, senza perdere il campione.
3. *Trattamento DNasi I*: questa fase si basa sulla degradazione del DNA presente all'interno dei nostri campioni in seguito all'aggiunta di una miscela contenente l'enzima DNasi I.
4. *Lavaggio dell'RNA*: il campione viene lavato con due diversi tamponi di lavaggio presenti all'interno del kit, per poi procedere alla fase di eluzione;
5. *Eluzione dell'RNA*: grazie all'azione di un opportuno tampone, è possibile separare l'RNA presente nel campione, dalle particelle magnetiche e trasferirlo in una nuova provetta.

Per ogni provetta contenente 150 μL di eluato, aggiungo 15 μL di Sodio Acetato 3 M, e 300 μL di Etanolo freddo (100%), in questo modo l'RNA si lega e precipita assieme al Sodio Acetato. I campioni si mettono per almeno una notte a -20°C per fare precipitare l'RNA.

Successivamente si passa alla fase di risospensione dell'RNA in acqua. In questa fase i campioni vengono addizionati di etanolo al 70%, per poi essere agitati, centrifugati e sottratti del surnatante, prestando particolare attenzione ad agire velocemente per non fare risospendere l'RNA nell'etanolo, rischiando di perderne una parte. Dopo aver lasciato le provette contenenti il pellet in termoblok per 5-10 min a 60°C , ed essersi assicurati che non vi siano più goccioline di etanolo all'interno delle provette, si risospende l'RNA in 50 μL di acqua autoclavata.

A questo punto è stato effettuato un controllo quantitativo mediante lettura spettrofotometrica. L'RNA è stato opportunamente diluito in acqua DEPC (5 μL di RNA totale in 55 μL di acqua DEPC, diluizione 1:12), ed è stato rilevato il valore di assorbanza a 260 nm, lunghezza d'onda di emissione caratteristica degli acidi nucleici, mediante uno spettrofotometro MBA 100 Perkin Elmer. Per risalire al valore di concentrazione dell'RNA totale, si considera che un ml di soluzione acquosa contenente 40 μg di RNA, a 260 nm fornisce un valore di assorbanza pari a 1, secondo la seguente formula:

$$\text{CONC RNA}_{\text{tot}}(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{(A_{260} \cdot 40 \cdot \text{fattore di diluizione})}{1000}$$

Dove A_{260} è la lettura di assorbanza a 260 nm.

Ora è possibile risalire al volume di RNA totale da aggiungere alla miscela di reazione di *retrotrascrizione*, allo scopo di caricare la stessa quantità di RNA per ogni campione, pari a 1 μg .

5.4.2 Trascrizione inversa

La *retrotrascrizione* (o trascrizione inversa), è la sintesi da parte di particolari enzimi, di una molecola di DNA a partire dall'RNA. L'enzima responsabile viene chiamato *trascrittasi inversa*, infatti è in grado di compiere il passaggio inverso rispetto agli altri enzimi responsabili della *trascrizione*, e che sintetizzano RNA a partire da DNA. La trascrittasi inversa è stata identificata nel genoma dei *retrovirus* (tra cui il virus dell'HIV), dai quali viene utilizzata per copiare l'informazione contenuta nel genoma virale (costituito da RNA) in una molecola di DNA a doppio filamento che può quindi integrarsi nel genoma della cellula ospite, dal quale può venire in seguito normalmente trascritto dando origine sia alle proteine virali che al genoma virale stesso. In questo modo il virus si può mantenere in forma latente anche per molti anni.

Questa reazione di *retrotrascrizione* viene utilizzata in biologia molecolare e in esperimenti di ingegneria genetica a partire da mRNA (RNA messaggero) purificato e porta alla sintesi di DNA complementare (cDNA), privo di introni, che può venire utilizzato per il clonaggio e la manipolazione del gene corrispondente. Generalmente si usa come stampo per la reazione di *retrotrascrizione* l'mRNA. La maggior parte degli mRNA degli eucarioti, portano all'estremità 3' una successione di residui di 15-20 nucleotidi di adenina, definite estremità poli(A). Per questo motivo di usano come inneschi o *primer* per la trascrittasi inversa oligonucleotidi sintetici complementari, formati da 15-20 nucleotidi deossitimidinici, definiti oligo (dT).

La sintesi del cDNA può essere indirizzata ad un gene specifico, ossia complementare ad una specifica sequenza dell'RNA stampo, oppure utilizzata per massimizzare la resa della reazione di retro trascrizione utilizzando dei *primer* a sequenza arbitraria (*random primer*). I *random primer* sono esameri composti da sei nucleotidi e rappresentano ogni esamero possibile, quindi si appaiono in maniera arbitraria alla sequenza di DNA e sono utilizzati in presenza di una miscela di deossinucleotidi (dNTP: dATP, dCTP, dGTP e dTTP).

Nel presente lavoro di tesi viene utilizzata quest'ultima strategia di sintesi del cDNA in quanto i *random primer* permettono una massimizzazione della resa di reazione di retrotrascrizione. La reazione avviene sottoponendo l'RNA estratto dai campioni ad un'incubazione organizzata in 3 differenti *step* termici.

Procedimento

Per effettuare la retrotrascrizione dell'RNA, preparo i reagenti in ghiaccio:

- _ Tampone;
- _ dNTP;
- _ Random primer *Sigma* (250 ng per 1 µg di RNA);
- _ Trascrittasi inversa (200 unità dell'enzima *RevertAid Reverse Transcriptase* della *Fermentas*).

La retrotrascrizione si effettua in 3 fasi:

- 1. Preincubazione dell'RNA** con i *primer* per favorire l'appaiamento: inserisco nelle mini-epENDORF, acqua, *random primer* e RNA. Dopo di che metto ad incubare 10 min a 25°C per incentivare l'ibridazione dei *random primer* sui filamenti di RNA.
- 2. Attivazione enzimatica:** i campioni vengono posti in ghiaccio per 5-10 min, dopo di che reinseriti per 60 minuti alla temperatura di 42°C, in questo modo avviene la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA.
- 3. Inattivazione enzimatica:** i campioni vengono portati ad una temperatura di 70°C per 15 minuti, in modo che la reazione si blocchi.

5.4.3 Reazione a catena della DNA-polimerasi

La PCR (*Polimerasi Chain Reaction*) è una tecnica di biologia molecolare, che consente la moltiplicazione (*amplificazione*) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere *in vitro* molto rapidamente la quantità di materiale genico necessaria per le successive applicazioni. Questa metodica fu ideata nel 1983 da Kary Mullins il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica. L'applicazione più comune PCR è lo studio dell'espressione genica, questo è di fondamentale importanza in molte aree della ricerca biomedica contemporanea, e ricopre un campo che va dalla scienza di base ad applicazioni industriali e di medicina. La PCR riproduce *in vitro* la sintesi di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il filamento

mancante viene ricostruito a partire da singoli nucleotidi, che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA d'interesse.

In natura, questo processo viene svolto da enzimi chiamati *DNA-polimerasi*, i quali sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA alle seguenti condizioni:

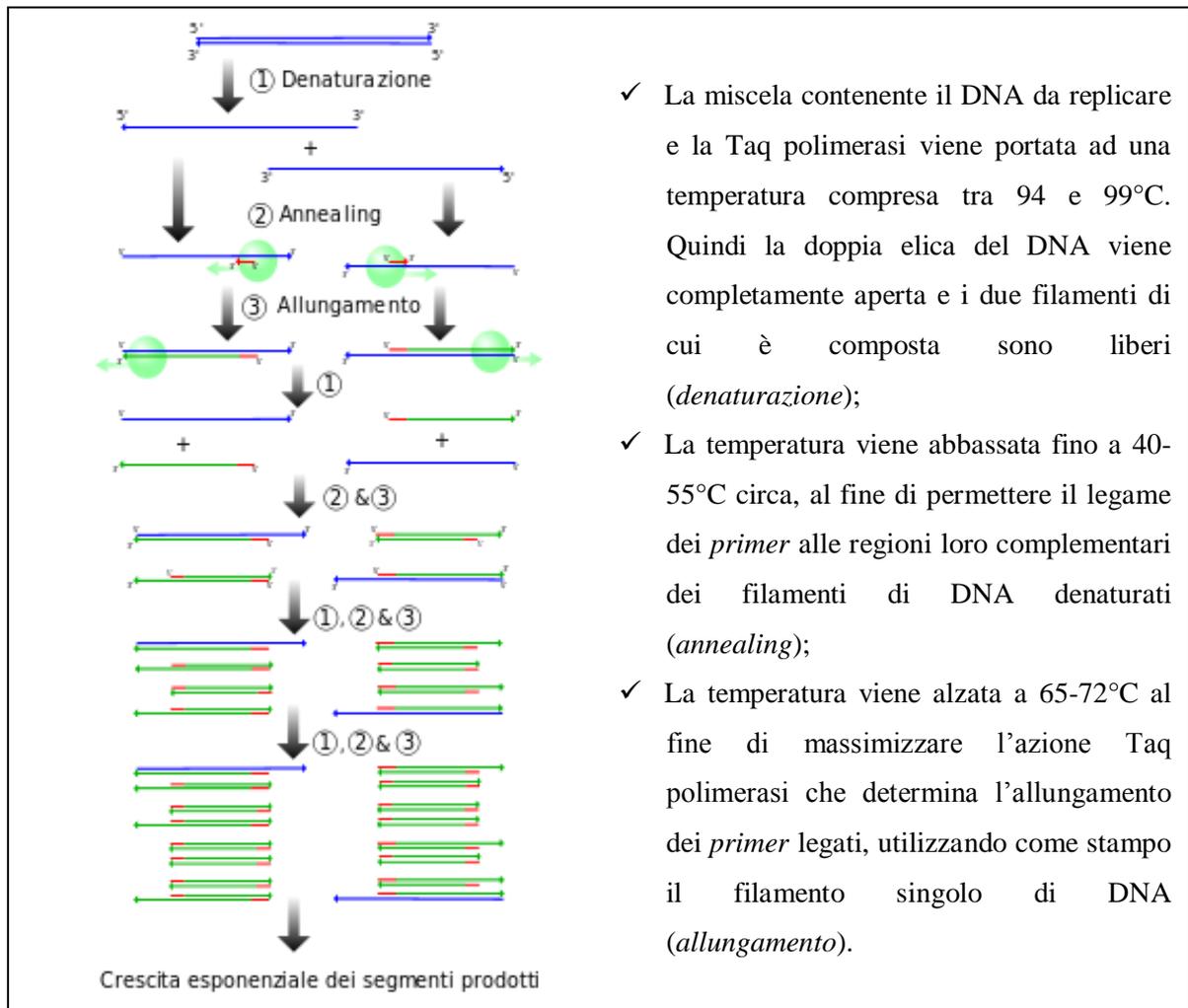
- I nucleotidi da polimerizzare devono essere disponibili sotto forma di *desossiribonucleotidi trifosfati (dNTP)*;
- Il DNA deve essere denaturato, quindi le due eliche che compongono i filamenti devono essere già separate;
- Non è possibile sintetizzare nuovo filamento senza partire da un innesco, ma il segmento da ricostruire può essere soltanto prolungato;
- Devono essere rispettate le opportune condizioni di temperatura e pH.

La PCR si basa sulle proprietà dell'enzima DNA-polimerasi di ripetere *in vitro*, quello che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA, cioè la sintesi di nuovi filamenti complementari ad un filamento stampo. Di pari importanza è la possibilità di questa tecnica di mirare ad uno specifico tratto di DNA scegliendo in modo opportuno i *primer*. I primer sono oligonucleotidi sintetici che presentano una dimensione di 10-30 pb (paia di basi), complementari alle regioni fiancheggianti il frammento genico da amplificare. L'appaiamento degli inneschi alla piccola regione di DNA da amplificare, dà origine a un frammento di DNA a doppia catena, dal quale la DNA-polimerasi può dare inizio alla sintesi. Questa avviene tramite la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore, e l'estremità 5' del desossinucleotide tri-fosfato (dNTP) complementare allo stampo.

E' possibile ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA tramite una *miscela* composta da:

- _ Quattro desossinucleotidi-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in quantità equimolari;
- _ Un tampone con la funzione di mantenere il pH stabile;
- _ *Primer* dei due filamenti del segmento da riprodurre;
- _ ioni Mg^{+2} , introdotti grazie all'aggiunta di $MgCl_2$, necessari per l'attivazione della DNA-polimerasi;
- _ acqua per portare a volume la soluzione;
- _ ed in fine una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre.

Per avviare la reazione della polimerasi, e quindi il prolungamento del filamento a partire dal primer 5', la reazione di PCR consiste in vari cicli di amplificazione. Ognuno di questi cicli è a sua volta costituito da tre fasi (figura 5.5).



- ✓ La miscela contenente il DNA da replicare e la Taq polimerasi viene portata ad una temperatura compresa tra 94 e 99°C. Quindi la doppia elica del DNA viene completamente aperta e i due filamenti di cui è composta sono liberi (*denaturazione*);
- ✓ La temperatura viene abbassata fino a 40-55°C circa, al fine di permettere il legame dei *primer* alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (*annealing*);
- ✓ La temperatura viene alzata a 65-72°C al fine di massimizzare l'azione Taq polimerasi che determina l'allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (*allungamento*).

Figura 5.5_ Schema delle fasi di una PCR.

E' impossibile eseguire questo processo impiegando la DNA-polimerasi umana, che viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione (96-99°C). Per ovviare a questo inconveniente si ricorre a polimerasi provenienti da organismi termofili che non vengono inattivate da alte temperature; come la *Taq polimerasi*, proveniente dal batterio termofilo *Thermophilus aquaticus*. Questo consente di realizzare più cicli di PCR in sequenza, in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti, ottenendo una **reazione a catena**, che permette una moltiplicazione esponenziale, estremamente rapida del materiale genetico di interesse.

Il ciclo suddetto viene ripetuto in genere 20-30 volte. Di solito non si superano i 50 cicli, dato che ad un certo punto la quantità di DNA ottenuto raggiunge un *plateau*. Ciò avviene ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei

dNTP. Bisogna inoltre considerare che si potrebbe amplificare in modo eccessivo anche eventuale materiale genomico contaminante.

Per avere una stima attendibile del numero di filamenti di DNA ottenuti dopo un certo numero di cicli si fa riferimento all'**efficienza** di ogni ciclo e può essere utilizzata la formula:

$$Y_n = A \cdot (1 + E)^n$$

Dove:

- Y_n = DNA prodotto dopo n cicli;
- A = quantità iniziale di DNA presente;
- n = numero di cicli di PCR effettuati;
- E = efficienza dell'amplificazione (in genere compresa tra 0,7 e 0,8).

Durante la fase di allestimento di una PCR è importante ottimizzare la quantità di DNA utilizzata (anche se non sempre è possibile) preparando una serie di reazioni di amplificazione in cui tutti i parametri siano fissi tranne il quantitativo di DNA impiegato in dosi scalari. Questo per evitare problematica dovute a:

– *Un basso quantitativo di bersaglio*, il quale aumenta la probabilità che vengano amplificate sequenze non specifiche;

– *Una quantità troppo elevata di cDNA*, che può far diminuire l'efficienza dell'amplificazione a causa della presenza di troppi elementi contaminanti e può rendere complessa la valutazione della resa della reazione durante i processi di ottimizzazione dei singoli parametri.

La *sensibilità* della reazione è molto alta, infatti per effettuare una PCR si possono utilizzare senza problemi piccole quantità di bersaglio, come 100 ng di DNA genomico, sufficiente per identificare un gene bersaglio presente in una singola copia.

5.4.4 PCR real-time

La PCR real-time o quantitativa permette simultaneamente di amplificare e quantificare in modo sensibile e riproducibile il DNA. La misurazione dei prodotti di PCR in tempo reale, appena essi si formano, permette di quantificarli durante la fase esponenziale della reazione di amplificazione, evitando così la variabilità associata alla PCR convenzionale.

Per la quantificazione del prodotto finale esistono due metodi differenti: uno si avvale di una sonda fluorescente, mentre l'altro utilizza un intercalante del DNA, in grado di legarsi non specificamente alla doppia elica del DNA (dsDNA). Nelle nostre analisi è stato

utilizzato quest'ultimo metodo e come intercalante è stato impiegato il *SYBER Green I*; un colorante che mostra una piccola fluorescenza quando è libero in soluzione, tale fenomeno aumenta di 1000 ordini di grandezza quando si lega al dsDNA (figura 5.6). Quindi, il segnale fluorescente complessivo derivante dalla reazione è proporzionale alla quantità di dsDNA presente, e crescerà con l'aumentare del *target* amplificato (Bio-Rad 2006).

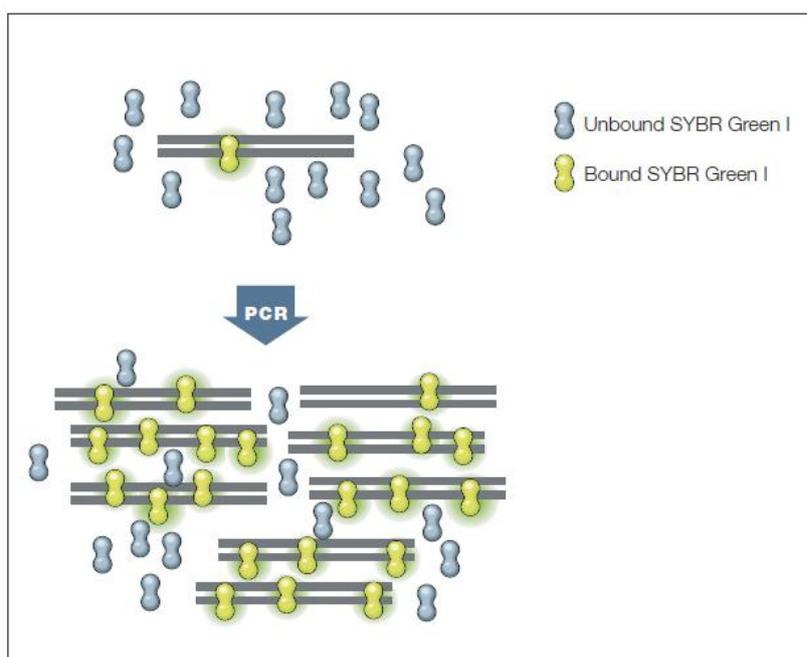


Figura 5.6 _Intercalante del DNA nella PCR real-time; la fluorescenza aumenta quando le molecole si legano al dsDNA.

Uno dei vantaggi dell'uso del SYBER Green è la semplicità della progettazione del saggio non è richiesta la sintesi di una sonda specifica, e la capacità di produrre la curva di *melting*, analisi che permette di verificare la specificità della reazione di amplificazione.

Dopo il completamento della reazione di amplificazione, la curva di *melting* è generata dal progressivo aumento della temperatura e consente di monitorare il segnale di fluorescenza per ogni step. Come il dsDNA nella reazione si denatura, la fluorescenza diminuisce. Possiamo stabilire T_m , come la temperatura alla quale il 50% delle paia di basi del dsDNA sono separate, che risulta differente per i vari prodotti ottenuti con la PCR. Se tutti i campioni sperimentali hanno la stessa T_m si possono escludere amplificati aspecifici. In figura 5.7 sono riportate le curve di *melting* ottenute durante una delle nostre analisi sperimentali: tutti i campioni analizzati con la stessa coppia di primer hanno prodotto curve di *melting* esattamente sovrapponibili, indicando la specificità del prodotto di reazione ottenuto. I differenti colori delle curve corrispondono alle differenti coppie di primer impiegate all'interno dello stesso esperimento.

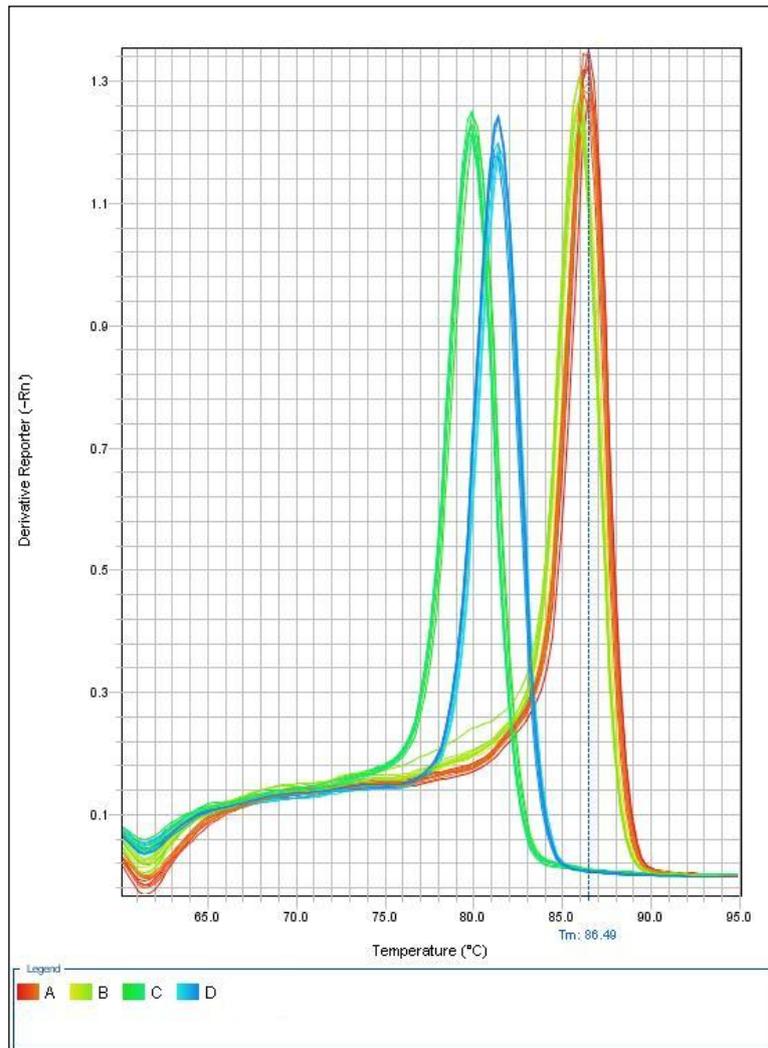


Figura 5.7_Curve di *melting*; A=AChEs, B=AChEr, C=GAPDH, D=Actina.

L'aumento dell'emissione di fluorescenza durante la reazione PCR, è valutata in tempo reale. Il software del computer costruisce il grafico di amplificazione utilizzando i dati di emissione di fluorescenza, che vengono raccolti durante la fase di prolungamento del filamento di DNA (figura 5.8), mostrando un grafico rappresentativo e definendo importanti fattori associati ad esso:

- *Linea di base*: è definita come quei cicli di PCR sotto ai quali ogni segnale di fluorescenza accumulato risulta al di sotto del limite di rilevamento dello strumento. Il computer, automaticamente, raccoglie i valori di fondo dal ciclo 3 al 15, in ogni caso spesso richiede di essere modificato manualmente;
- ΔRn : viene calcolato dal programma usando questa equazione:

$$Rn = Rnf - Rnb$$

dove Rnf è l'emissione di fluorescenza del prodotto al variare del tempo, e Rnb è l'emissione di fluorescenza alla linea di base. Il valore di ΔRn viene rappresentato nel

grafico in funzione del numero di cicli. Durante i primi cicli dell'amplificazione in PCR, i valori ΔRn non superano la linea base;

- **Soglia:** viene scelta arbitrariamente una soglia basata sulla variabilità della linea base, tramite il computer. Viene calcolata in 10 volte la deviazione standard del segnale medio della linea base. Un segnale fluorescente individuato sopra la soglia viene considerato un segnale reale che può essere usato per definire il *ciclo soglia* (Ct) per un campione. Se richiesto la soglia può essere cambiata manualmente per ogni esperimento così che questo sia nella regione dell'amplificazione esponenziale in ogni grafico.
- **Ct :** questo è definito come una frazione di ciclo nel quale la fluorescenza riportata è maggiore del minimo livello di rilevazione (es. linea di base). Ct è il principio alla base della PCR real-time ed è un componente essenziale per produrre dati accurati e riproducibili. Il segnale di Ct si verificherà sempre durante la fase esponenziale dell'amplificazione del target, che avviene durante i primi cicli di PCR. Come i componenti della reazione diventano limitanti, il tasso dell'amplificazione del filamento target diminuisce fino a che la reazione PCR non genera più un modello lineare (fase di plateau) e l'aumento di prodotti è minimo o assente. Questa è la ragione principale del perché Ct è la misura più sicura del numero di copie iniziali, invece che la misura della quantità dei prodotti PCR accumulati. Durante la fase esponenziale, nessun componente di reazione è limitante, di conseguenza i valori di Ct sono riproducibili per reazioni di replicazione con lo stesso numero di copie iniziali.

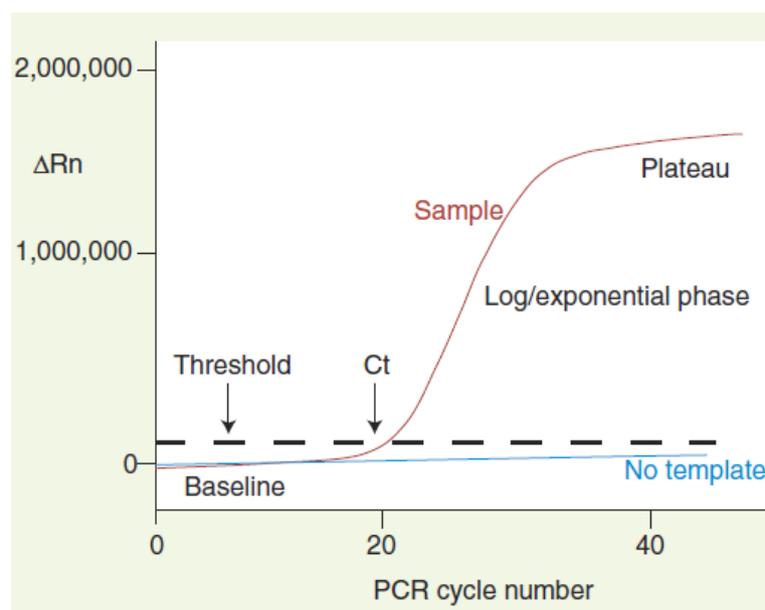


Figura 5.8_Modello di grafico riferito a una singola amplificazione in PCR real-time.

La quantificazione dei target presenti nel campione d'interesse può essere eseguita in due modi differenti: la quantificazione assoluta tramite curva standard o la quantificazione

relativa. Noi abbiamo seguito il secondo metodo, conosciuto anche come “*metodo comparativo della soglia*” (metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Questo metodo elimina la necessità di curve standard ed utilizza equazioni matematiche per il calcolo dei livelli di espressione relativa del target rispetto al campione di controllo o calibratore. La quantità di gene target nel campione, normalizzata su geni endogeni *housekeeping*, e relativa al calibratore è data dalla seguente formula:

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

Dove:

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{campione}) - \Delta Ct(\text{calibratore})$
- $\Delta Ct = Ct(\text{gene housekeeping}) - Ct(\text{gene target})$

Per fare sì che il calcolo sia valido, e che i risultati siano affidabili, è necessario che l'efficienza di amplificazione del gene *housekeeping* e del gene target siano approssimativamente uguali o sopra al 90%. In esperimenti di PCR real-time bisogna evitare possibili fonti di errore come differenze nella quantità iniziale di RNA, della qualità di RNA o differenze nell'efficienza del cDNA di sintesi e amplificazione nella PCR. Per minimizzare questi errori e correggere la variabilità da campione a campione, è necessario che un RNA cellulare venga simultaneamente amplificato con il target; questo serve per avere un riferimento interno sul quale altri valori di RNA possono essere normalizzati. I geni *housekeeping* più comuni utilizzati per la normalizzazione sono *beta-actina*, una proteina del citoscheletro, la *gliceraldeide-3-fosfatodeidrogenasi* (GAPDH), un enzima glicolitico, e l'RNA ribosomiale. Questi geni vengono teoricamente espressi a livelli costanti in differenti tessuti dell'organismo, a tutti i livelli di sviluppo, in differenti condizioni sperimentali. In realtà nessuno di questi geni *housekeeping* risponde perfettamente a queste caratteristiche; è consigliabile scegliere uno o preferibilmente più geni *housekeeping* per ogni specifico esperimento e valutarne l'effettiva stabilità (Arya 2005).

Messa a punto del metodo

Individuazione dei geni per il controllo endogeno

Dalla letteratura scientifica riguardante lo studio dell'espressione genica in cellule PC12, abbiamo scelto 15 coppie di *primer* per geni *housekeeping* e 2 coppie di *primer* specifici per la forma R e S dell'AChE per consentire la quantificazione del DNA relativo alle due differenti isoforme (tabella 5.1). Le 15 coppie di *primer* per i geni *housekeeping* sono state

selezionate attraverso due passaggi per individuare quelle adatte al nostro sistema sperimentale:

I. Analisi tramite PCR semi-quantitativa al fine scegliere le coppie di primer che funzionano con efficienza applicando una temperatura di annealing di 60°C:

condizione sperimentale richiesta per il funzionamento ottimale della master mix (iTAQ UniverCYBR Green, Biorad), impiegata nei nostri esperimenti di PCR real-time. Nella PCR semi-quantitativa la rivelazione della quantità di prodotto è effettuata ad un determinato ciclo, stabilito in modo tale che la reazione sia ancora nella fase lineare, e quindi la quantità di amplificato prodotto sia dipendente in modo lineare dalla quantità di cDNA stampo inizialmente presente nel campione. Il rilevamento del prodotto genico avviene dopo aver eseguito la reazione di PCR, tramite l'uso del gel Red come intercalante del DNA e sottoponendo i campioni a *corsa elettroforetica su gel d'aragoso*.

L'elettroforesi si basa sulla separazione del DNA per migrazione delle molecole nel gel, sotto l'azione di un campo elettrico con direzione costante, generato da una differenza di potenziale applicata agli elettrodi di una cella elettroforetica. La molecola di DNA risulta carica negativamente a causa dei gruppi fosfato legati al carbonio 5' di ogni nucleotide. Infatti durante la corsa elettroforetica, il DNA tende a migrare verso il polo positivo con una velocità inversamente proporzionale al suo peso.

I prodotti di amplificazione vengono inseriti negli appositi pozzetti creati nel gel, viene applicata una corrente di 5V/cm di gel per 30 min. La visualizzazione delle bande avviene tramite l'uso di un transilluminatore, il quale emettendo raggi UV, evidenzia le bande di DNA.

II. Individuazione dei primer più appropriati con PCR real-time, secondo la

“classifica di stabilità”: dopo la prima selezione dei *primer* fatta tramite PCR semiquantitativa, atta a determinare quelli che funzionavano ad una temperatura di annealing di 60°C e davano come prodotto di reazione una banda netta, senza prodotti aspecifici, sono stati selezionate con la PCR real time le coppie di primer più stabili nelle nostre condizioni sperimentali. Abbiamo messo a confronto nella stessa reazione l'espressione genica dei geni housekeeping nei campioni di controllo ed in quelli esposti ai differenti trattamenti, al fine di individuare i geni con l'espressione più stabile nelle nostre condizioni sperimentali. I dati ottenuti sono stati poi inseriti all'interno del programma “*Cotton Est Database*”, il quale ci ha permesso di stilare una **classifica di stabilità** allo scopo di selezionare i geni *housekeeping* più stabili e adatti per nostro sistema sperimentale.

Gene ID	primer seq	REFERENCE
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	ACCACGAGAAATATGACAACTCCC	WANG ET AL (2010) BBRC 400
	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	
beta-actin (ACTb)	GCTATGAGCTGCCTGACGGT	WANG ET AL (2010) BBRC 400
	GTTTCATGGATGCCACAGGA	
hydroxymethylbilane synthase (Hmbs)	GAGACCATGCAGGCCACCAT	WANG ET AL (2010) BBRC 400
	TTGGAATGTTCCGGGCAGTG	
ribosomal protein 29 (Rpl29)	ACAGAAATGGCATCAAGAAACCC	WANG ET AL (2010) BBRC 400
	TCTTGTGTGCTTCTTGCCAAA	
ribosomal protein 19 (Rpl19)	AACACCTTGGCCCGACGGAA	WANG ET AL (2010) BBRC 400
	TTGCATCCAGGTCACCTTCTC	
ribosomal protein 3 (Rpl3)	TGGCAAGATGAGATGATTGACGTC	WANG ET AL (2010) BBRC 400
	GGGTCTTTCGGGGCAGCTTCTTT	
beta-actin (ACTb)	CTAAGGCCAACCGTGAAA	Ellefsen et al (2012) Innovative Methodology
	CTCGAAGCTAGGGCAAC	
Cyclophilin A	GGATTTGGCTATAAGGGTTC	Ellefsen et al (2012) Innovative Methodology
	GTTGTCCACAGTCGGAGA	
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GATTTGGCCGTATCGGAC	Ellefsen et al (2012) Innovative Methodology
	GAAGACGCCAGTAGACTC	
ribosomal protein 32 (RPL-32)	TCGGCCTCTGGTGAAG	Ellefsen et al (2012) Innovative Methodology
	AGGACACATTGTGAGCAATC	
PolR2A	TGTATCCGTA CTACACAGC	Ellefsen et al (2012) Innovative Methodology
	GTAGAAGAGCGGGTAAAC	
beta2-microglobulin (β-mg)	GAAGGAGCCCAAACCGTC	Ellefsen et al (2012) Innovative Methodology
	GTCAGATGATTAGAGCTCCAT	
Ubiquitin C (Ub-C)	AGCCAGTGTACCACCAAG	Oxidative Medicine and Cellular Longevity
	TCACACCCAAGAACAAGCAC	
beta-microglobulin (β-mg)	ATGGGAAGCCGAACATACTG	Bournival et al (2012) Oxidative Medicine and
	CAGTCTCAGTGGGGTGAAT	
AChE-S (Acetylcholinesterase)	GTGAGCCTGAACCTGAAGCC	López-Granero et al (2012) Toxicol Sci.
	TCCTGCTTGCTATAGTGGTC	
AChE-R (Acetylcholinesterase)	GTGAGCCTGAACCTGAAGCC	López-Granero et al (2012) Toxicol Sci.
	GTGGAGAAGAGAGGGATTAC	
18S-RNA	GGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAAT	Zhu LJ, Altmann SW.(2005)
	TTGCCCTCCAATGGATCCT	

Tabella 5.1_ Elenco delle 17 coppie di primer utilizzate nel lavoro.

Procedimento di analisi

L'analisi dell'espressione genica e quindi l'utilizzo della PCR real-time, richiede 3 fasi principali:

- Costruzione delle curve standard;
- Analisi dei campioni sperimentali in PCR real-time;
- Normalizzazione su geni *housekeeping*.

La **costruzione delle curve standard**, prevede l'impiego di varie concentrazioni di cDNA per verificare che le condizioni sperimentali siano ottimali e l'amplificato prodotto sia direttamente proporzionale al cDNA di partenza. Il primo step consiste nel stabilire lo schema delle concentrazioni e le dosi di cDNA che vogliamo utilizzare. In un saggio tipico con i primer per i geni *housekeeping* abbiamo scalato di un fattore di 5 per 8 diverse concentrazioni:

50/ 10/ 2/ 0,4/ 0,08/ 0,016/ 0,003/ 0,001 ng.

In una piastra per il saggio PCR sono presenti 48 pozzetti, questo significa che possiamo analizzare in una reazione di PCR 3 coppie di *primer*, considerando che vogliamo ottenere una curva standard con 8 concentrazioni di ciascuna. Quindi preparo 3 diverse *Mix* per ogni coppia di *primer* che vogliamo saggiare, aggiungendo nel seguente ordine tali componenti:

- Primer (0,2 μ M);
- Master Mix (5 μ L) contenente buffer, DNA-polimerasi, dNTPs, colorante SYBER Green I (i Taq Univer SYBER Green Biorad);
- cDNA (3 μ L dell'opportuna diluizione di campione);
- Acqua (quantità necessaria per arrivare al volume finale di 10 μ L).

Dopo aver agitato e centrifugato la piastra, la pongo all'interno del termociclatore. Le curve standard vengono ricavate anche impiegando i *primer* per i geni delle isoforme AChE_R e AChE_S, seguendo lo stesso procedimento, con l'unica modifica che le 8 concentrazioni di cDNA variano da 50 a 0,4 ng diluendo 1:2 ogni volta e che i primer erano ad una concentrazione 0,5 μ M .

Dopo aver scelto le condizioni sperimentali per la reazione di PCR e gli opportuni geni *housekeeping*, si sceglie dalle curve standard una quantità di cDNA da saggiare per ogni coppia di *primer* e si analizzano i campioni sperimentali avendo cura di analizzare nella stessa reazione di PCR simultaneamente i *primer* per i geni AChE e quelli per i geni *housekeeping*, nei campioni sperimentali in presenza dei relativi controlli (tabella 5.2).

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
AChE _S							
AChE _R							
GAPDH 1							
ACT							

Tabella 5.2_ disegno sperimentale dell'analisi dei campioni in PCR real-time.

5.5 TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard e i dati sono ricavati da almeno 4 esperimenti indipendenti. La significatività dei risultati è stata valutata grazie al programma *Sigma Stat (Jandel Scientific)* mediante ANOVA ad una via. Le differenze di ciascun campione rispetto al controllo sperimentale, considerate statisticamente significative per $p < 0,05$, sono state valutate mediante t-test.

6. RISULTATI

I risultati contenuti in questo lavoro riguardano la valutazione dell'attività dell'enzima AChE e la valutazione delle costanti cinetiche, K_m e V_{max} . Inoltre è stata valutata mediante PCR real-time l'espressione dei geni codificanti per le due forme dell'enzima, AChE_S e AChE_R.

6.1 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ENZIMATICA DELL'AChE

6.1.1 Valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP

L'analisi dell'attività enzimatica di campioni trattati con forskolin e dbcAMP, consiste in una fase preliminare allo studio dell'espressione genica dell'AChE in cellule esposte a campi elettromagnetici.

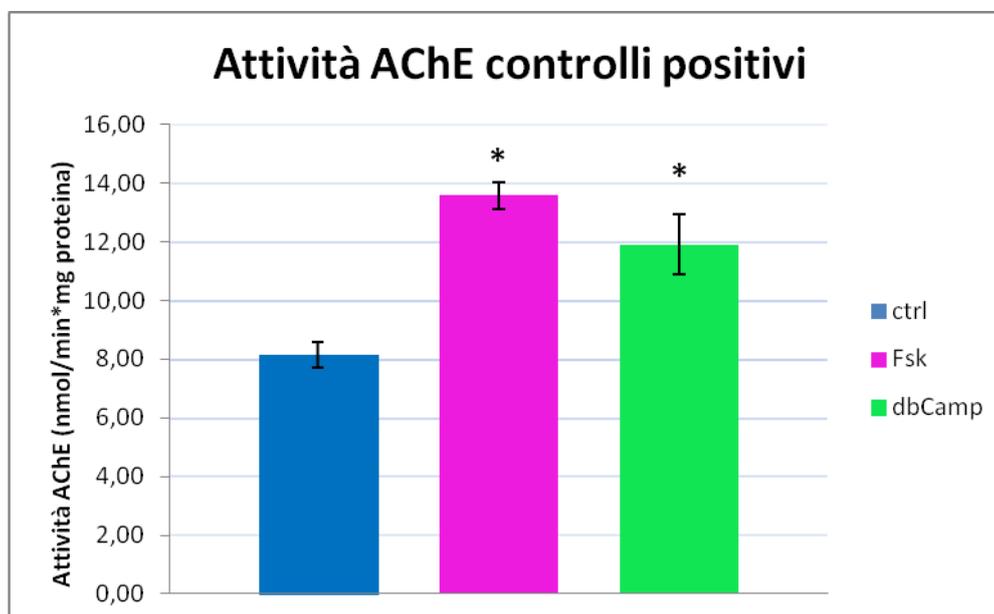


Figura 6.1 _Attività enzimatica dell'AChE nei controlli positivi, a seguito di un trattamento di 48 h . I valori ottenuti con il trattamento da forskolin derivano dalla media di 10 esperimenti indipendenti, mentre quelli del dbcAMP derivano dalla media di 6 esperimenti. Le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso dal controllo; $P < 0,05$).

Questa fase gioca un duplice ruolo; il primo è quello di valutare la risposta delle cellule PC12 a una sostanza con effetto noto sull'espressione di AChE, l'altra importante funzione è quella di accertare la corretta caratterizzazione dei risultati ottenuti con i metodi di analisi. Queste funzioni fanno sì che i campioni di cellule trattate con queste sostanze costituiscano i nostri controlli positivi.

Le cellule PC12 sono state trattate per 48 h con una soluzione di forskolin 10 μ M, oppure con una soluzione di dbcAMP 100 μ M. Seguendo il protocollo di Ellman è stata svolta l'analisi enzimatica per la valutazione dell'attività dell'enzima AChE nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate.

Come è possibile osservare in figura 6.1, l'attività dell'AChE risponde positivamente al trattamento con forskolin, con un aumento significativo valutato rispetto al campione di controllo pari a 1,7 volte; anche il trattamento con dbcAMP mostra buoni risultati, con un aumento di attività pari a 1,5 volte.

6.1.2 Valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito ad esposizione a EMF ad alta frequenza

La valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE è stata effettuata nelle PC12 dopo esposizione alla modalità GSM 217 Hz, alla frequenza portante di 1,8 GHz, per un periodo di 24 ore. Sono stati effettuati 6 esperimenti di irraggiamento indipendenti.

Le analisi svolte per rilevare eventuali alterazioni dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito all'esposizione a campi elettromagnetici hanno evidenziato un aumento significativo dei valori nei campioni irraggiati rispetto ai campioni *sham* di circa 1,4 volte (figura 6.2).

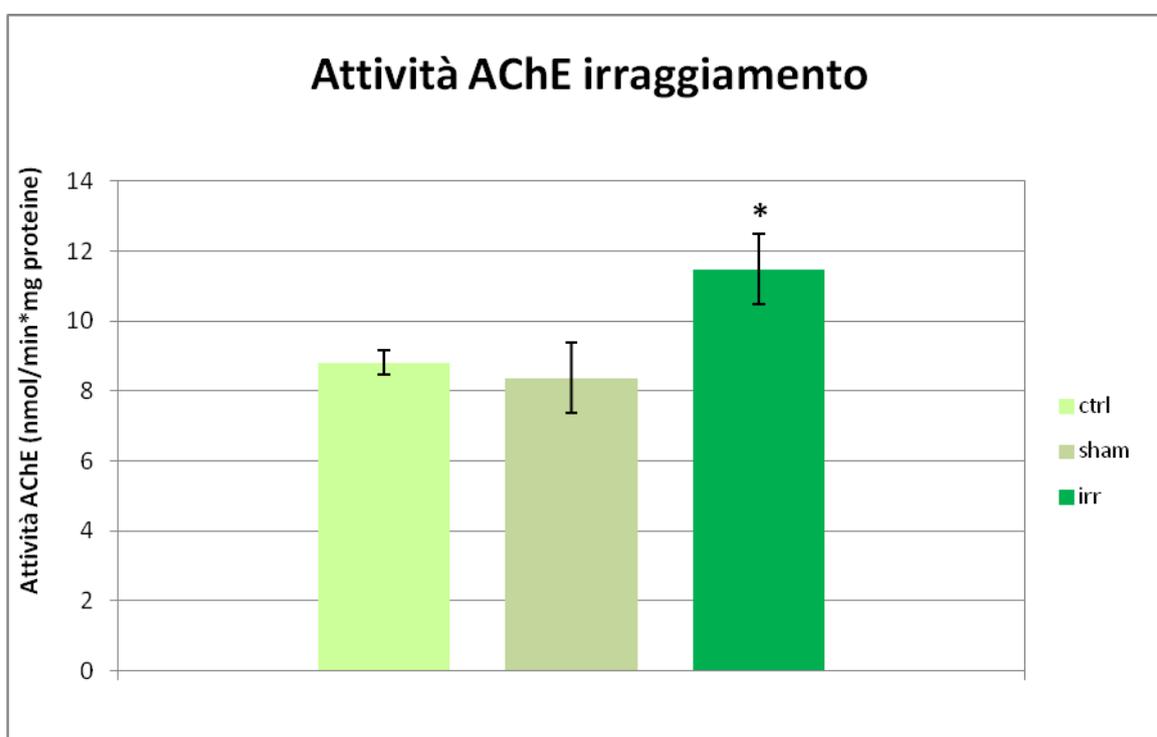


Figura 6.2 Attività dell'enzima AChE in campioni irraggiati per 24 h con EMF alla frequenza di 1,8 GHz nella modalità 217 Hz. Sham = campione alloggiato nella guida d'onda non esposta ad irraggiamento; irr = campione esposto ad irraggiamento; ctrl = campione mantenuto in analogo incubatore non contenente la strumentazione per l'irraggiamento. I valori rappresentano la media di 6 esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard (* significativamente diverso da sham e controllo P<0,05).

6.1.3 Valutazione dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito a stress termico

I campioni sottoposti a stress termico sono stati esposti alla temperatura di 40°C per 6 ore. Dal grafico (figura 6.3) è possibile notare un aumento dell'attività enzimatica nei campioni esposti a stress termico, tali alterazioni però non risultano statisticamente significative rispetto al controllo.

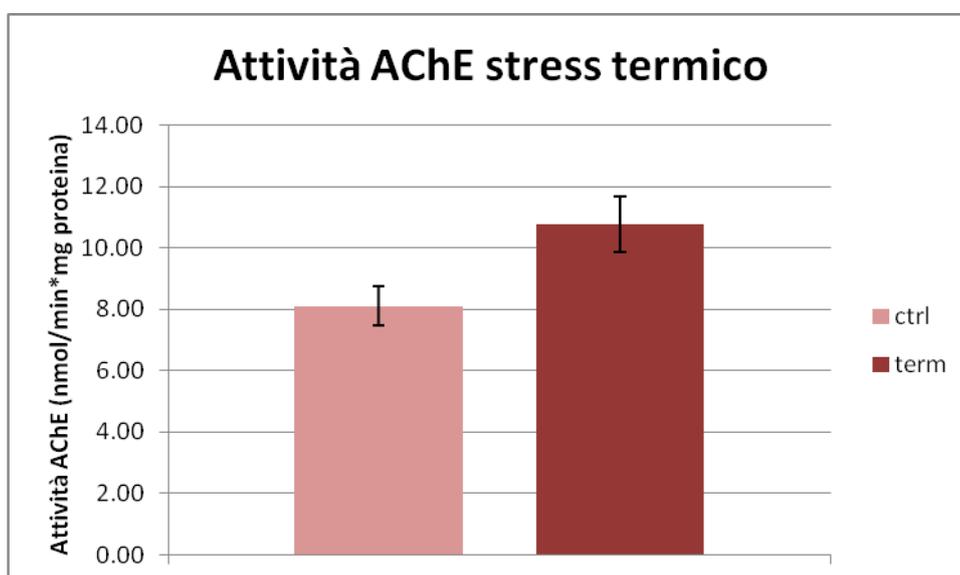


Figura 6.3 Attività dell'Enzima AChE in campioni mantenuti alla temperatura di 40°C per 6 ore. Ctrl = campione di controllo; term = campione sottoposto a stress termico. I valori rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard (* significativamente diverso da sham; $P < 0,05$).

6.2 VALUTAZIONE DELLA CINETICA ENZIMATICA DI AChE

Dopo aver osservato un aumento nell'attività dell'AChE nei campioni esposti a EMF, è stata studiata la cinetica dell'enzima. Lo studio della cinetica di reazione consiste nel valutare la velocità di reazione dell'AChE in presenza di concentrazioni crescenti di substrato (ASCh). Sono state utilizzate concentrazioni che vanno da 0,01 mM a 3,16 mM e sono state calcolate poi V_{max} e K_m .

6.2.1 Valutazione della cinetica enzimatica dell'AChE in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP

Lo studio sulla cinetica enzimatica mostra un aumento significativo della V_{max} dei campioni trattati per un periodo di 48 h con forskolin e dbcAMP, rispetto il controllo, mentre la K_m rimane costante (figura 6.4).

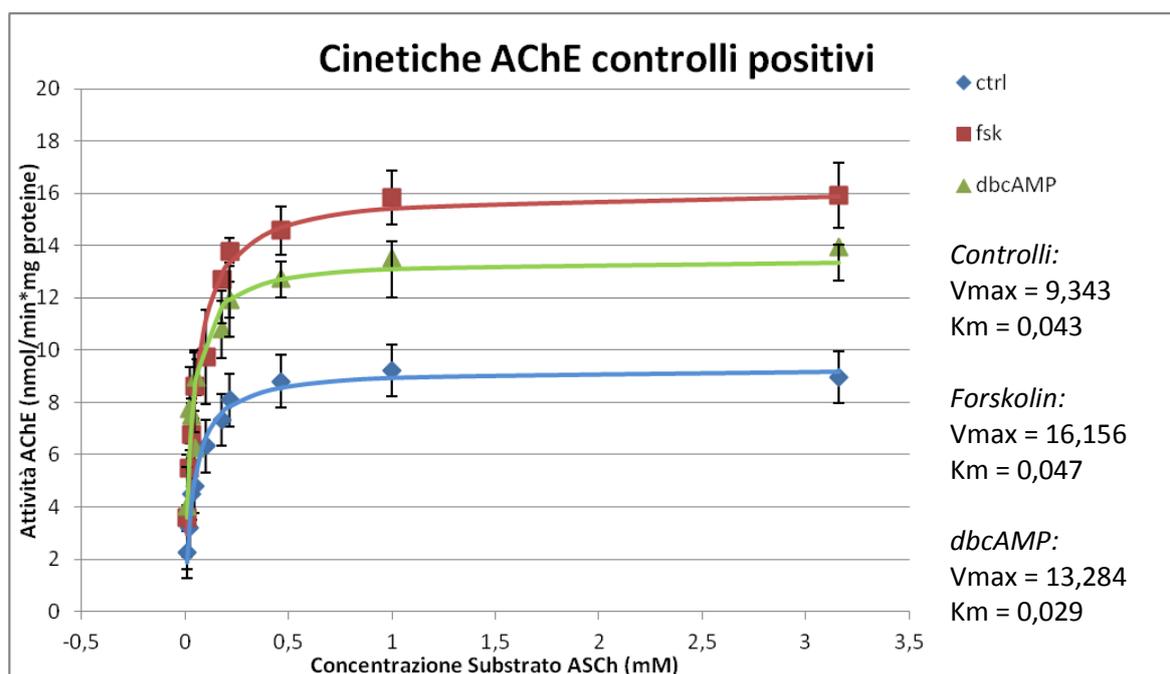


Figura 6.4_Cinetica dell'AChE espressa come velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato a seguito di trattamenti con forskolin e dbcAMP. I valori corrispondono alla media di 5 esperimenti nel caso del controllo, 3 esperimenti nel caso del forskolin, e 3 nel caso del dbcAMP. Le barre rappresentano l'errore standard. I risultati dell'analisi statistica sono riportati in tabella 6.1.

6.2.2 Valutazione della cinetica enzimatica dell'AChE in seguito ad esposizione a EMF ad alta frequenza

E' stata valutata la cinetica dell'enzima AChE esponendo le cellule ai campi elettromagnetici con modulazione d'impulso a 217 Hz per 24 h. La curva di cinetica enzimatica è rappresentata in figura 6.5. Anche in questo caso è stato riscontrato un aumento statisticamente significativo della Vmax, mentre i valori di Km restano costanti rispetto ai campioni di controllo e sham.

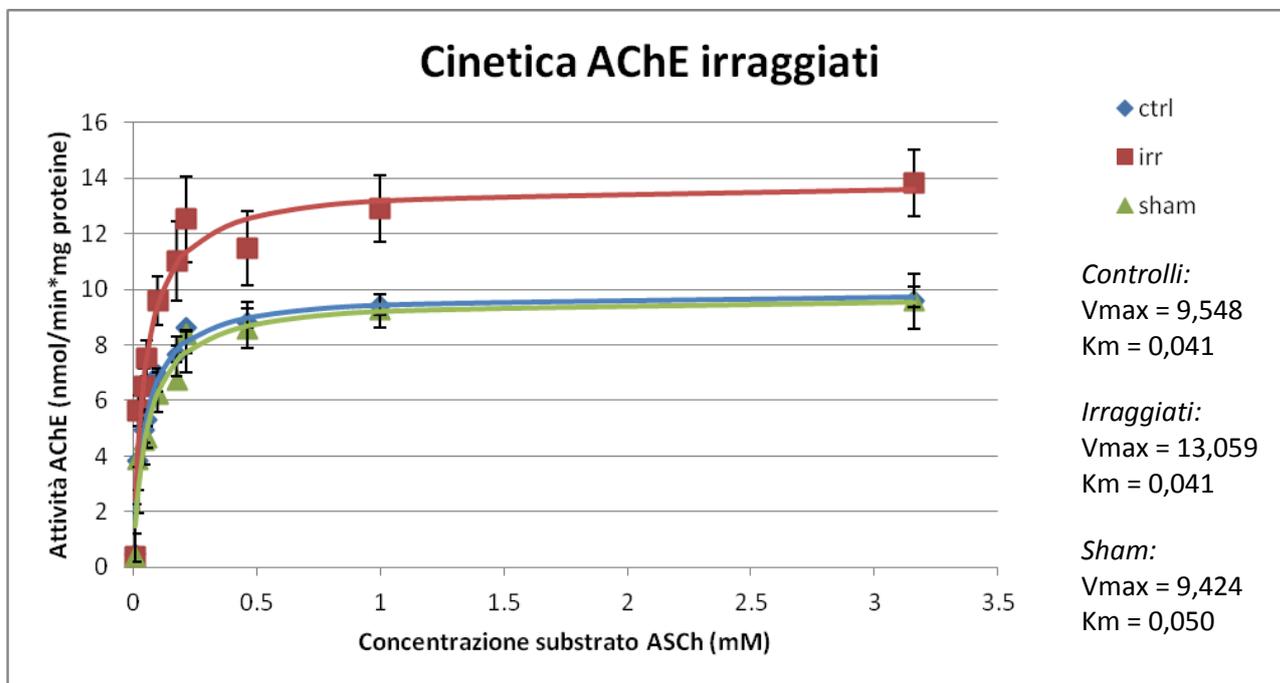


Figura 6.5_Cinetica dell'AChE, espressa come velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato, a seguito di irraggiamento nella modalità GSM 217 Hz. Sham = campione alloggiato nella guida d'onda non esposto ad irraggiamento; irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori rappresentano la media di 4 esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard.

6.2.3 Valutazione della cinetica enzimatica dell'AChE in seguito a stress termico

Per valutare la cinetica enzimatica in condizioni di stress termico abbiamo posto le cellule in un bagno maria alla temperatura di 40°C per 6 h. Il grafico in figura 6.6, suggerisce un aumento della Vmax nei campioni esposti a stress termico, tale variazione però, non risulta statisticamente significativa.

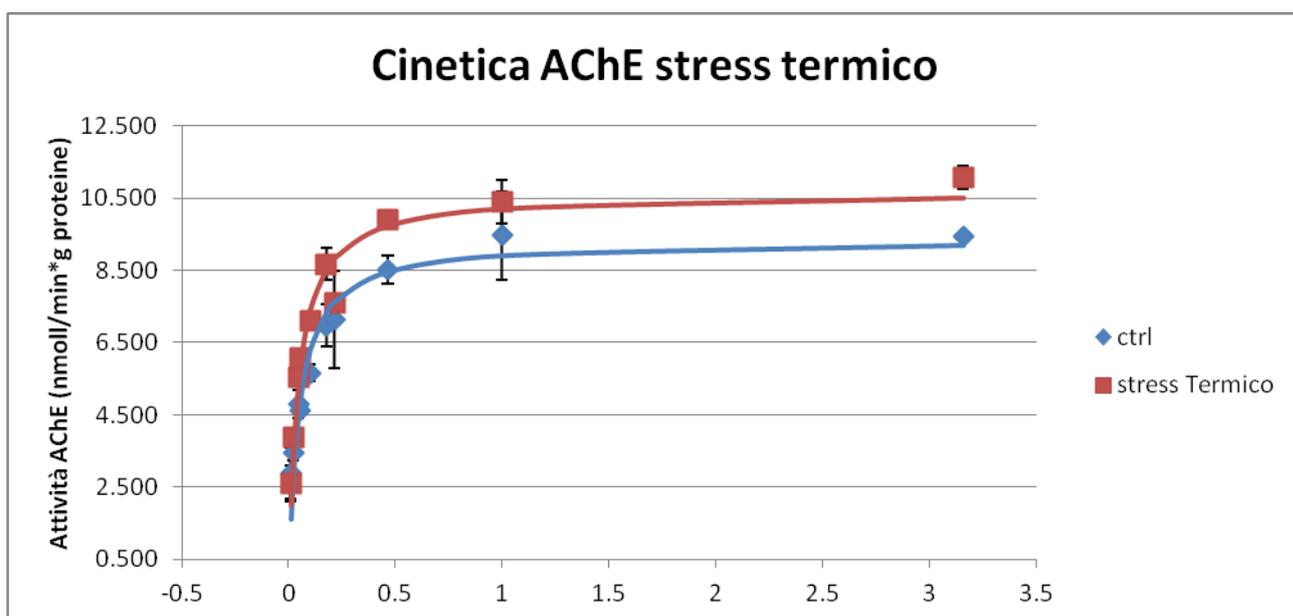


Figura 6.6_Cinetica dell'AChE espressa come velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato a seguito di stress termico alla temperatura di 40°C per 6 h. I valori utilizzati corrispondono alla media di 3 esperimenti. Le barre di errore rappresentano l'errore standard.

6.2.4 Valutazione dei parametri della cinetica enzimatica

In tabella 6.1 sono riassunti i valori di Vmax e Km dell'AChE, con i rispettivi errori standard, in seguito ai diversi trattamenti effettuati.

E' possibile osservare come il valore di Vmax aumenti sia in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP, che in seguito ad irraggiamento, e quanto questi valori risultino significativamente maggiori rispetto ai propri controlli.

TRATTAMENTO	Vmax		Km	
	(nmol/min/mg prot)	E.S.	(μ M)	E.S.
ctrl	9,343	0,305	0,043	0,006
fsk	16,156 *	0,394	0,047	0,004
dbcAMP	13,284 *	0,718	0,029	0,007
ctrl irr	9,548	0,137	0,041	0,006
sham	9,424	0,074	0,050	0,007
irr	13,059 *	0,699	0,041	0,005
ctrl term	9,317	0,404	0,048	0,009
term	10,661	0,353	0,044	0,006

Tabella 6.1_. Schema riassuntivo dei valori di Vmax e Km dell'AChE e rispettivi errori standard in seguito ad esposizione delle cellule PC12 a EMF e a trattamento con forskolin e dbcAMP. *= statisticamente significativo rispetto allo sham. Sham = campione alloggiato nella guida d'onda non esposto ad irraggiamento; irr = campione esposto ad irraggiamento; ctrl = campione mantenuto in analogo incubatore non contenente la strumentazione per l'irraggiamento.

6.3 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL'ACHÉ

Successivamente alla valutazione dell'attività enzimatica, sono stati svolti irraggiamenti nella modalità GSM 217 Hz per 24 h, per poi valutare eventuali variazioni nei livelli di espressione genica dell'ACHÉ. Si è proceduto con l'estrazione dell'mRNA, retroscritto e amplificato mediante PCR real-time quantitativa. Mediante l'utilizzo di *primer* specifici è stato possibile valutare le isoforme "s" e "r" dell'enzima.

6.3.1 Risultati relativi alla messa a punto del metodo di analisi mediante PCR real-time

Scelta dei geni housekeeping adatti al nostro sistema sperimentale

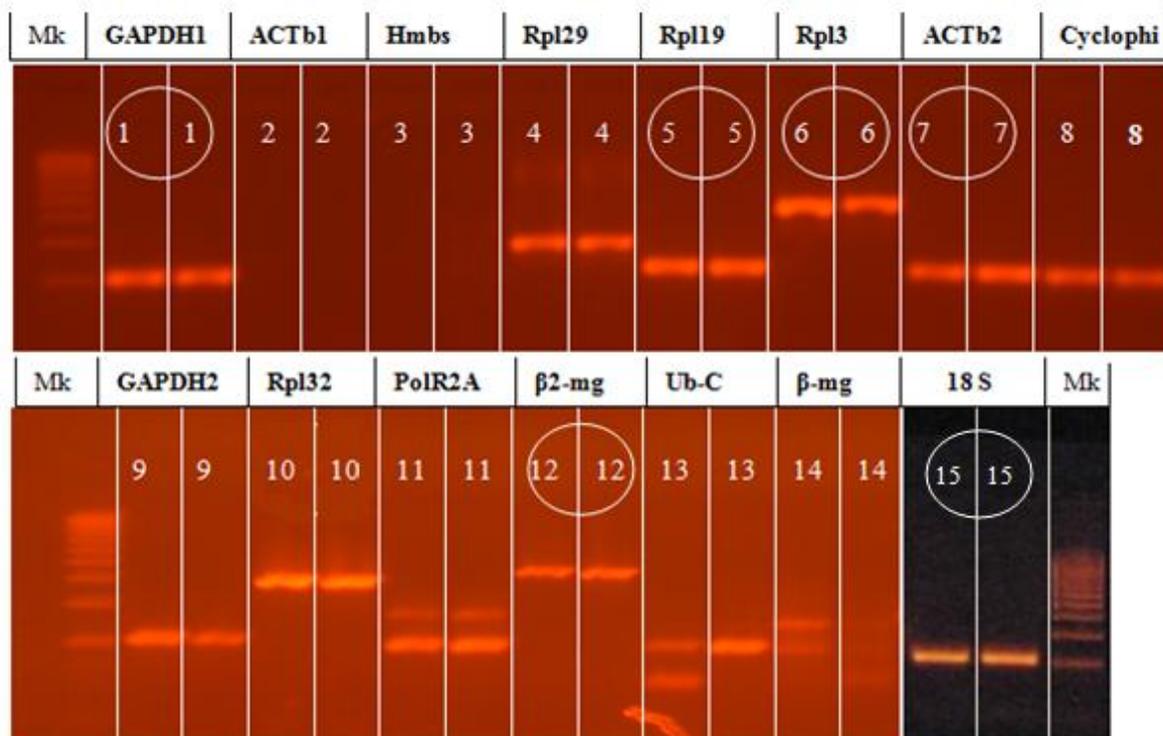


Figura 6.7_Migrazione del DNA (dall'alto verso il basso), valutata per ciascuna coppia di *primer*, ognuna saggiata su 2 diversi campioni sperimentali di controllo. Le bande nel primo e ultimo pozzetto rappresentano il *marcatore di peso molecolare* noto.

I. Prima selezione delle coppie di primer per i geni housekeeping tramite PCR semi-quantitativa.

Le 15 coppie di *primer* per i geni housekeeping sono state analizzate tramite PCR semi-quantitativa per selezionare quelle che funzionano ad una temperatura di annealing di 60°C, richiesta dal nostro sistema sperimentale. I risultati ottenuti in

seguito all'elettroforesi dei frammenti amplificati con ogni coppia di *primer* sono riportati in fig 6.7. In base alla nettezza della banda ottenuta e all'assenza di frammenti aspecifici, abbiamo selezionato le seguenti coppie di primer: **GAPDH 1; Rpl 19; Rpl 3; ACTb2; β 2-mg e 18 S**.

II. Individuazione dei geni *housekeeping* più stabili nelle nostre condizioni sperimentali, con PCR real-time, secondo la “classifica di stabilità”:

Le 6 coppie di *primer* per i geni *housekeeping* selezionate dopo la prima fase sono state impiegate in un saggio di PCR real-time, mettendo a confronto nella stessa reazione l'espressione genica dei geni *housekeeping* nei campioni di controllo ed in quelli esposti ai differenti trattamenti, al fine di individuare i geni con l'espressione più stabile nelle nostre condizioni sperimentali. La classifica di stabilità ottenuta con il programma “*Cotton database*” indica come come geni più stabili (figura 6.8), i 2 geni *housekeeping* ACTb2 e GAPDH e suggerisce di utilizzarli entrambi per normalizzare i dati di espressione genica dei nostri campioni.

Method	Ranking Order (Better--Good--Average)					
	1	2	3	4	5	6
Delta CT	MICROG	ACT	GADPH_F1	18S_SHORT	RPL19	RPL3
BestKeeper	MICROG	ACT	GADPH_F1	18S_SHORT	RPL3	RPL19
Normfinder	MICROG	ACT	GADPH_F1	18S_SHORT	RPL19	RPL3
Genorm	GADPH_F1 ACT		MICROG	18S_SHORT	RPL19	RPL3
Recommended comprehensive ranking	MICROG	ACT	GADPH_F1	18S_SHORT	RPL19	RPL3

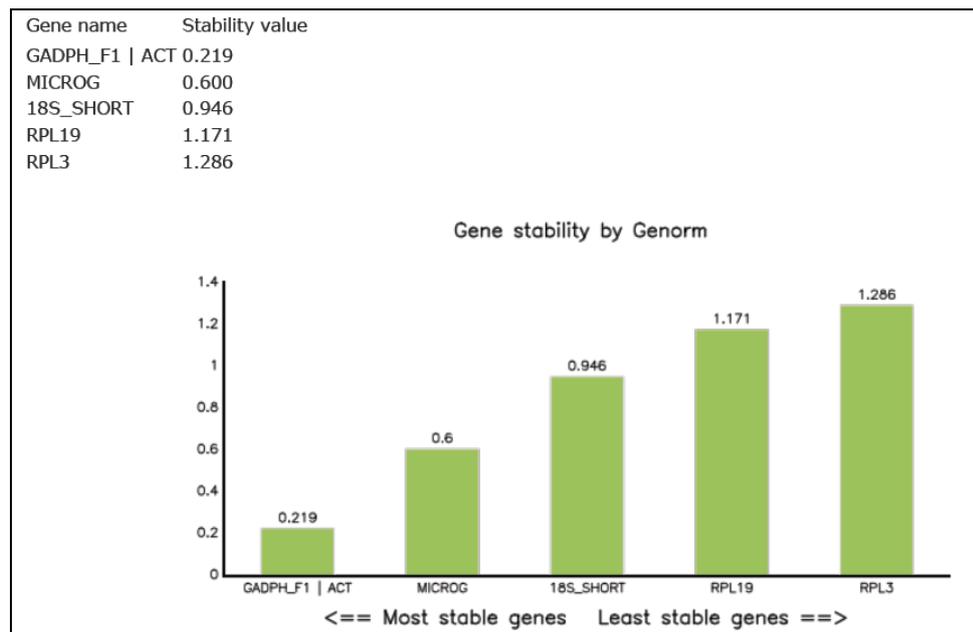


Figura 6.8_Classifica di stabilità dei geni *housekeeping*.

Preparazione dell curve standard e valutazione delle efficienze di reazione

Dopo aver individuato 4 coppie di *primer* da impiegare nelle analisi sperimentali; due di geni *housekeeping* e due per le isoforme di AChE, sono state valutate le efficienze di reazione tramite le curve standard, i risultati sono indicati in tabella 6.2.

Primer	Rsq	Efficienza	Range cDNA (ng)
AChE _R (0,5uM)	0,990	104,1	25 – 0.78
AChE _S (0,5uM)	0,994	107,7	50 – 0.39
GADPH 1 (0,2uM)	0,994	112,4	50 – 0,001
Actb 2 (0,2uM)	0,998	100,0	50 – 0,001

Tabella 6.2_ Valori di efficienza dei *primer*, espressione relativa (Rsq) e range di cDNA.

6.3.2 Valutazione dell'espressione genica dell'AChE in seguito a trattamento con forskolin e dbcAMP

Com'è possibile osservare dalla figura 6.9, l'aumento di espressione genica di AChE dei campioni trattati con forskolin e dbcAMP, risulta essere statisticamente significativa rispetto ai controlli. Questo è confermato per i trascritti di entrambe le forme di AChE in esame.

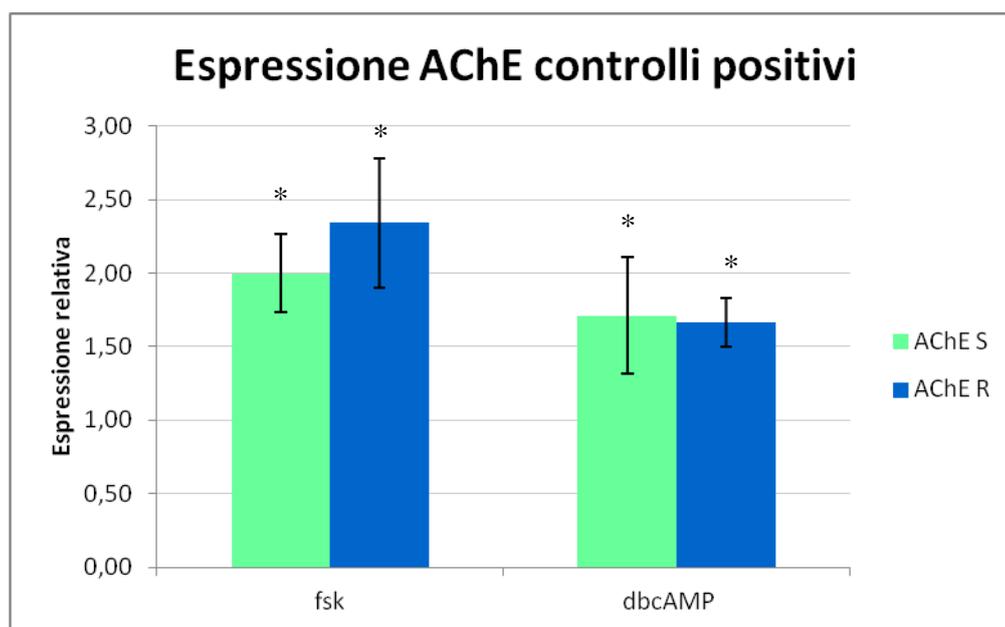


Figura 6.9 Espressione relativa dei prodotti genici AChE_S ed AChE_R in campioni trattati per 48 h con forskolin e dbcAMP. I valori derivano dalla media di 4 esperimenti diversi e vengono riportati come espressione relativa dei trattati sui controlli pari a 1. Le barre di errore riportano l'errore standard.

6.3.3 Valutazione dell'espressione genica dell'AChE in seguito ad esposizione a EMF ad alta frequenza

Le cellule PC12 sono state esposte per 24 h a campi elettromagnetici alla frequenza di 1,8 GHz con modulazione d'impulso a 217 Hz. Come è possibile osservare in figura 6.10, l'analisi non ha mostrato variazioni significative dei livelli di espressione genica di AChE nei campioni irraggiati rispetto ai campioni *sham*.

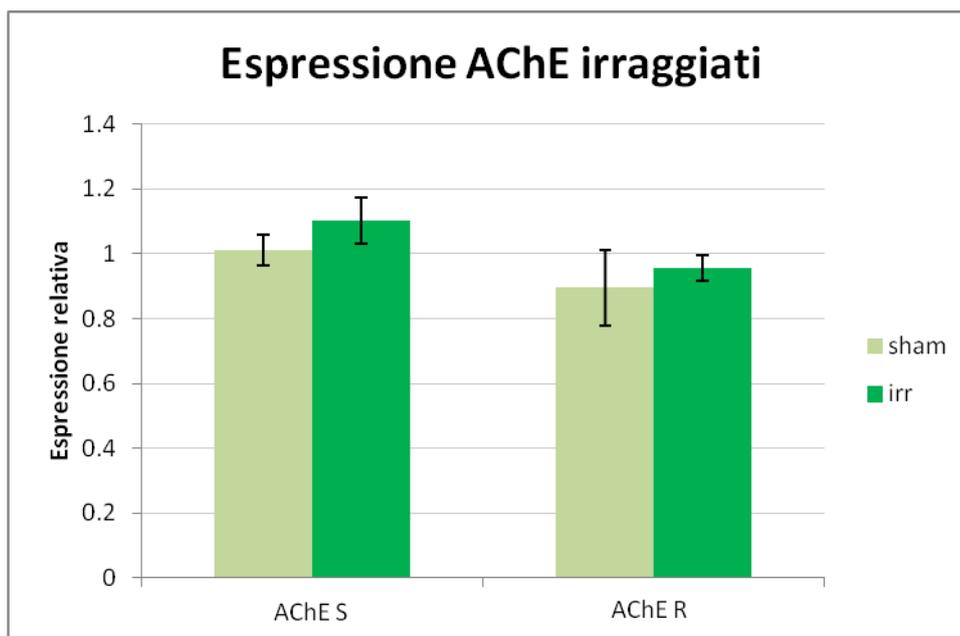


Figura 6.10 _Espressione del prodotto genico AChE in campioni irraggiati per 24 h con EMF alla frequenza di 1,8 GHz nella modalità 217 Hz. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori derivano dalla media di 4 esperimenti indipendenti e vengono riportati come espressione relativa degli irraggiati e degli *sham* rispetto ai controlli. Le barre d'errore riportano l'errore standard.

6.3.4 Valutazione dell'espressione genica dell'AChE in seguito a stress termico

Le cellule PC12 sono state portate alla temperatura di 40°C per un periodo di tempo di 6 h. In seguito è stato estratto l'mRNA, retrotrascritto e amplificato mediante PCR real-time. Com'è possibile notare in figura 6.11 l'analisi dell'espressione genica non ha mostrato variazioni significative dei trascritti di AChE nei campioni sottoposti a stress termico rispetto a quelli di controllo.

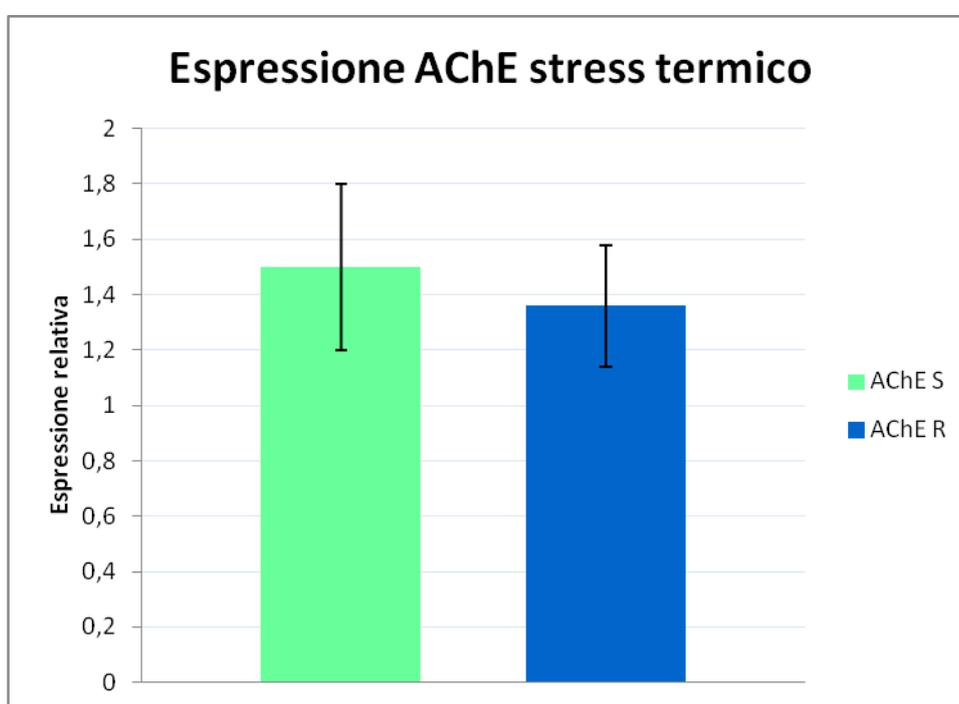


Figura 6.11_ Espressione del prodotto genico AChE in campioni mantenuti per 6 h alla temperatura di 40°C . I valori derivano dalla media di 3 esperimenti diversi e vengono riportati come espressione relativa dei trattati sui controlli pari a 1. Le barre di errore riportano l'errore standard.

8. DISCUSSIONE

L'interesse verso i campi elettromagnetici ha assunto negli ultimi anni un'importanza crescente legata al contemporaneo frenetico sviluppo di nuovi sistemi di telecomunicazione, i cui impianti si sono diffusi in maniera capillare in ambito urbano, destando dubbi e preoccupazioni circa la loro pericolosità. A partire dagli anni 80, la comunità scientifica ha mostrato un particolare interesse alla correlazione tra campi elettromagnetici ed effetti sull'organismo umano e animale, generando una molteplicità di studi epidemiologici e di laboratorio.

Lo scenario dei risultati riguardanti la correlazione di campi elettromagnetici ed effetti biologici appare vasto e spesso controverso; mentre da un lato viene affermata una correlazione tra modificazione delle funzioni colinergiche a seguito di esposizione di animali a EMF, dall'altro non ci sono evidenze in meccanismi fisiologici. E' stata affermata la presenza di rotture del filamento di DNA in tessuti testicolari e cerebrali in roditori esposti, ma complessivamente gli studi affermano che non ci sia correlazione tra EMF e cancro. Tra questi sono presenti anche studi che confermano l'esistenza di una correlazione tra EMF e variazioni nell'attività enzimatica dell' AChE, probabilmente come risposta ad uno stress indotto dai campi elettromagnetici. A questo proposito, risulta interessante l'aumento significativo dell'espressione genica dei trascritti di proteine da stress termico (HSP70) in seguito all'esposizione di 16 h di irraggiamento con modalità GSM-217 Hz, e nella modalità talk a 4 e 16 h di irraggiamento in trofoblasti umani in coltura (Franzellitti et al. 2006). Inoltre in studi precedenti l'aumento di HSP70 è stato correlato ad un modesto innalzamento dell'espressione dei livelli di mRNA di AChE totali e della sua variante di splicing "R" valutato con PCR real-time in cellule di neuroblastoma di topo (Perrier 2005).

Questo studio si focalizza infatti sull'AChE, che svolge un ruolo importante all'interno del sistema nervoso, oltre ad essere strettamente correlata a malattie degenerative come il morbo di Alzheimer e coinvolta nel processo di apoptosi in vari tipi di cellule (Peng Jing et al. 2008), nonché correlata ad alcuni tipi di tumori come meningioma, astrocitoma e glioblastoma (Dan Grisaru 1999).

I risultati evidenziati nella tesi di Ciancaglini (2010) mostrano una mancata variazione dell'espressione proteica dell'AChE dei campioni esposti a EMF, rispetto a quelli di controllo, a seguito di analisi con Western Blotting. Nello stesso lavoro le cellule sono state esposte a campi elettromagnetici nelle tre modalità d'irraggiamento: segnale CW, e

due differenti tipi di modulazione del segnale GSM, vale a dire 217 Hz e Talk per 4, 16, 24 ore ad un valore medio di SAR pari a 2 W/Kg, con lo stesso irraggiatore utilizzato nel presente lavoro di tesi. Tali risultati però non hanno mostrato alcuna variazione significativa dei livelli di espressione proteica dell'AChE rispetto ai campioni di controllo, in alcuna delle modalità di irraggiamento testate, indipendentemente dal tempo di esposizione. Nello stesso lavoro è stata valutata anche l'espressione genica dell'AChE_S, tramite l'impiego di PCR semi-quantitativa; anche in questo caso le analisi non hanno evidenziato alcun aumento o riduzione significativa dei livelli di espressione genica dell'AChE.

Il presente lavoro vuole ulteriormente approfondire questi studi indagando sugli effetti dei campi elettromagnetici con frequenza pari a 1,8 GHz (segnale GSM), e con SAR applicato pari a 2 W/Kg su cellule PC12 in coltura. Il target biologico di studio è stato l'enzima AChE, di cui è stata valutata oltre all'attività enzimatica, anche l'espressione genica delle due forme enzimatiche S ed R mediante PCR real time.

In una fase preliminare all'analisi dei campioni esposti a EMF, sono stati svolti esperimenti che ponevano a confronto controlli positivi con campioni di controllo, al fine di valutare la capacità delle cellule PC12 di rispondere ad uno stimolo noto, e di verificare che i metodi di analisi siano in grado di rilevare eventuali variazioni nell'attività e nell'espressione dell'AChE. Questi esperimenti preliminari sono utilizzati per determinare gli effetti da parte del forskolin, un attivatore del segnale AMP-ciclico dipendente, noto per indurre l'attività e l'espressione dell'enzima (Choi et al. 2008). Si è scelto di effettuare due differenti trattamenti per i controlli positivi, nel primo caso è stato somministrato appunto il forskolin 10 µM, nel secondo caso è stato utilizzato direttamente un analogo dell'AMP-ciclico, il *dibutyrylcAMP* (dbcAMP) 100 µM. Dopo 48 h di esposizione, per quanto riguarda il trattamento con forskolin si è osservato un aumento significativo dell'attività enzimatica dell'AChE rispetto ai controlli di circa 1,7 volte, anche i campioni trattati con il dbcAMP hanno rivelato un aumento di attività seppur minore, pari a 1,5 volte.

Dopo aver constatato la validità dei controlli positivi, si è proceduto con gli esperimenti di esposizione a EMF. Gli esperimenti consistono nell'esporre le cellule PC12 a campi elettromagnetici alla frequenza portante di 1,8 GHz con modalità di modulazione GSM-217 Hz per 24 h, utilizzando il sistema di irraggiamento progettato e costruito dall'IT'S-Foundation di Zurigo descritto nel capitolo "Materiali e Metodi". Gli esperimenti sono stati eseguiti in *cieco*, in quanto la guida irraggiata era scelta casualmente dal computer e tale informazione era resa nota all'operatore solo dopo aver effettuato le analisi. Questo offre il

vantaggio di eliminare la soggettività in questa fase, che potrebbe in qualche misura, influire sulla corretta valutazione dei risultati. Quindi si è condotta l'analisi dell'attività enzimatica dell'AChE allo scopo di identificare possibili variazioni nella velocità di reazione dell'enzima con il substrato a seguito dell'esposizione a EMF. Il risultato osservato è un aumento dell'attività enzimatica statisticamente significativa dei campioni irraggiati rispetto ai controlli di circa 1,4 volte.

Per confronto, è risultato interessante valutare l'effetto dello stress termico, in quanto è stato riportato da Chen et al. (2010), che l'esposizione a 40 °C provoca aumento dell'espressione dell'AChE di circa 15 volte in cellule NG108-15. Inoltre è stato osservato anche un aumento dell'attività enzimatica dell'AChE di 3 volte, sia in forma monomeric (G₁), che in forma dimerica (G₂), la quale raggiunge un massimo dopo 6 h di esposizione, mentre i livelli di attività enzimatica della forma tetrameric (G₄) rimangono invariati (Chen et al., 2010). Tuttavia, nel modello biologico impiegato nel presente studio, le cellule PC12, non si sono osservate variazioni nell'attività enzimatica, né cambiamenti statisticamente significativi nell'espressione genica dell'AChE. Esperimenti precedenti effettuati nello stesso laboratorio in cui è stato svolto il presente lavoro di tesi, avevano evidenziato comunque che lo stress termico rappresenta uno stimolo al quale le cellule PC12 rispondono con un aumento dell'espressione genica e proteica delle HSP 70 (proteine indotte dallo stress).

A posteriori dell'avvenuto aumento dell'attività dell'AChE a seguito dell'esposizione a EMF, è stata valutata la cinetica di reazione dell'AChE, valutando l'attività dell'enzima in presenza di concentrazioni crescenti di substrato analizzando i parametri che rappresentano le grandezze caratterizzanti della cinetica enzimatica: V_{max} e K_m. La V_{max} indica la velocità di reazione massima ottenibile quando tutto l'enzima viene utilizzato nella reazione, è quindi indicatrice della quantità di molecole di enzima che hanno reagito con il substrato, mentre la K_m esprime l'affinità dell'enzima per il substrato. L'analisi della cinetica enzimatica dei controlli positivi (forskolin e dbcAMP) e dei campioni irraggiati ha evidenziato un aumento significativo rispetto ai campioni di controllo della V_{max}, mentre i valori di K_m sono rimasti costanti in tutti i campioni analizzati. Sulla base di questi dati è stata formulata l'ipotesi che l'aumento dell'attività enzimatica fosse dovuto ad un aumento della quantità di molecole di AChE dopo l'esposizione delle cellule a EMF per 24 h.

Per verificare questa ipotesi è stata analizzata l'espressione genica dell'AChE mediante PCR real-time. La disponibilità di una tecnologia avanzata come la PCR real-time permette di avere precise informazioni sulla quantità (relativa o assoluta) dei trascritti genici,

rappresentando un passo avanti rispetto ai risultati di esperimenti precedenti (Ciancaglini, 2010). Questa ulteriore valutazione è giustificata dal fatto che con la PCR semiquantitativa impiegata in quel lavoro era molto difficile distinguere un piccolo effetto dalla mancanza di effetti, aspetto essenziale nello studio sui possibili effetti biologici dei campi elettromagnetici.

Il risultato delle analisi di PCR real-time danno come risultato un aumento significativo dell'espressione dell'enzima nei controlli positivi. Appare invece evidente che i campioni irraggiati non subiscono alcun cambiamento significativo nell'espressione di AChE rispetto ai campioni di controllo. In quest'ultima fase sono stati utilizzati *primer* specifici per le 2 differenti isoforme AChE_S e AChE_R, per poter quantificare questi 2 trascritti distintamente. I risultati indicano che nessuna delle due forme contribuisce all'aumento dell'espressione genica a seguito dell'esposizione a campi. Nei controlli positivi, oltre all'aumento significativo dell'isoforma S è possibile osservare un aumento dell'espressione del trascritto R; è stato affermato che l'espressione dell'isoforma AChE_R (< del 2% in cellule cerebrali) può aumentare in condizioni di stress acuto nei topi, o a seguito di stress termico in cellule di coltura. Questa forma enzimatica sembra contribuire significativamente alla regolazione colinergica tramite idrolisi di ACh nel sistema nervoso, inoltre gioca un ruolo importante nel sistema immunitario (Massoulié et al. 2005).

L'aumento dell'attività enzimatica di AChE, non accompagnato da aumento dell'affinità per il substrato a livello del suo sito attivo, né da un aumento della trascrizione genica, potrebbe allora essere dovuto a interazioni tra campi elettromagnetici e altri domini della proteina diversi dal sito d'interazione con il substrato. I campi elettromagnetici infatti potrebbero influenzare il microambiente di membrana che circonda l'enzima, tramite l'apertura di canali ionici che regolano gli elementi polari della membrana plasmatica. Inoltre è da tenere presente che è proprio l'elevata carica negativa presente sulla superficie della molecola di AChE a determinare la tipologia e la modalità di legame.

La maggior parte dell'AChE nel nostro sistema nervoso centrale è presente nella forma tetrameric AChE_T ancorata alla membrana delle cellule neuronali tramite (Hicks et al. 2011), di conseguenza cambiamenti delle condizioni all'interno della matrice lipidica, potrebbero avere una forte influenza sulla flessibilità della molecola proteica, una caratteristica che influenza fortemente la sua attività funzionale (Calzia et al. 2010). Nello studio di Volpe et al. (1998), a seguito di irraggiamento a campi pulsati con frequenza di 50 Hz sono state indotte variazioni nelle dinamiche molecolari dei lipidi presenti nelle membrane cellulari. L'ipotesi di un aumento dell'attività enzimatica a causa di una

variazione del numero di turnover dell'ACH_E, che corrisponde al numero netto di molecole di substrato convertite in prodotto da una singola molecola di enzima, quando quest'ultimo è completamente saturato dal substrato, resta comunque da verificare.

Nel 2011 la IARC, ha classificato i campi elettromagnetici come “possibilmente cancerogeni”, anche se non c'è stata alcuna richiesta per l'adozione di misure precauzionali di limitazione nell'uso dei telefoni cellulari. L'argomento in questione è molto delicato e gli interessi economici oltre a quelli sanitari sono elevati, considerando che affermazioni pubbliche riguardanti la pericolosità dei campi elettromagnetici potrebbero destare la preoccupazione, in alcuni casi, anche eccessiva dei consumatori e dell'opinione pubblica, generando falsi allarmismi.

Affrontando il tema ad una certa distanza dall'argomento specifico di questo lavoro di tesi, è possibile affermare che le radiazioni emesse dai cellulari influiscono, tramite un meccanismo non ancora chiaro, sul nostro organismo, provocando un effetto. Questo dovrebbe direzionare il nostro comportamento verso un approccio precauzionistico nei confronti dell'uso di telefonini, inoltre nelle informazioni presenti nei manuali dei cellulari sono indicate distanze di sicurezza da mantenere tra l'apparecchio e la testa che variano a seconda dei diversi modelli dei cellulari da 1,5 a 2,5 centimetri. A questo punto, sarebbe opportuno prestare alcuni accorgimenti nell'utilizzo del cellulare, come tenere ad una certa distanza l'apparecchio tramite l'utilizzo di auricolare, vivavoce o sms; la distanza in questo caso è “nostra amica”, considerando che le radiazioni si disperdono con il suo quadrato.

L'interpretazione dei diversi studi citati precedentemente può essere controversa a causa della vasta gamma di opinioni all'interno della comunità scientifica e non solo. Per il raggiungimento del massimo consenso possibile deve essere effettuata una valutazione globale (valutazione del rischio sanitario), basandosi su revisioni già effettuate da altri gruppi di esperti nazionali ed internazionali (OMS). Nonostante questo esiste sempre la possibilità di riscontrare incertezze e incongruenze nella valutazione comparativa dei dati, in quanto qualsiasi valutazione, almeno in parte si basa su giudizi.

L'esistenza di effetti sanitari ben accertati costituisce la base delle attuali linee guida per l'esposizione a campi elettromagnetici. I programmi di ricerca possono però richiedere diversi anni per essere completati, e anche la lunga latenza di malattie come il cancro può impedire la rapida conclusione di alcuni studi. Grazie agli studi epidemiologici è possibile valutare effetti a lungo termine che presentano una diretta rilevanza, ma allo stesso tempo non possono fornire una prova sufficiente di relazione causale in assenza di plausibilità

biologica, o del sostegno dei dati forniti da studi sperimentali. E' per questo motivo, che nel presente lavoro si è scelto di contribuire allo studio degli effetti biologici dei campi elettromagnetici.

I risultati negativi (nessun effetto osservato) ottenuti in questo lavoro relativamente alla espressione di geni che codificano per l'AChE, contribuiscono alla valutazione dell'evidenza scientifica quanto quelli positivi (effetto osservato). In questo campo di studio, infatti, è importante avere a disposizione una base di dati equilibrata per evitare distorsioni di pubblicazione. Le riviste tendono a pubblicare articoli che riportano dati positivi piuttosto che quelli negativi, e questo purtroppo non consente di identificare la soglia al di sotto della quale non si hanno effetti e non si possono definire limiti (OMS, 2008).

9. CONCLUSIONI

Il vasto panorama degli studi riguardanti gli effetti biologici dei campi elettromagnetici ha fornito risultati spesso contraddittori e difficilmente confrontabili a causa di condizioni sperimentali differenti. Tra questi sono presenti anche studi che hanno ottenuto come risultato una variazione dell'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi (AChE).

Il presente lavoro di tesi si è occupato di indagare sui possibili effetti dei campi elettromagnetici (EMF) ad alta frequenza sull'attività e l'espressione genica e proteica dell'enzima AChE, tramite esperimenti che prevedono l'irraggiamento di campioni di cellule PC12 alla frequenza portante di 1,8 GHz e alla modulazione di 217 Hz per 24 h. Il lavoro continua ed approfondisce studi precedenti condotti su queste o altre cellule utilizzando lo stesso sistema di esposizione ai campi e le medesime condizioni sperimentali.

I risultati ottenuti mostrano un aumento dell'attività dell'enzima AChE dei campioni irraggiati rispetto ai controlli, con variazione della V_{max} ma non della K_m , mentre non è stata rilevata alcuna variazione significativa dell'espressione genica, analizzata mediante PCR real-time.

Nelle cellule PC12, si aveva una maggiore attività ed espressione genica dell'enzima in cellule trattate con forskolin e dbcAMP, suggerendo il coinvolgimento del sistema AMPc – dipendente nel controllo dell'attività dell'enzima. L'AMPc, pur agendo tipicamente come secondo messaggero nella trasduzione del segnale chimico, in molte cellule di diversi organismi sembra essere aumentato anche in condizioni di stress. In particolare l'effetto si esplicava anche sulla isoforma AChE_R, indotta in condizioni di stress. Le cellule PC12 esposte a condizioni di stress fisico diverso dai campi elettromagnetici (stress termico in particolare) non mostravano alterazioni nell'attività dell'enzima o nella espressione dei relativi trascritti genici.

Il fatto che l'aumento dell'attività enzimatica di AChE non sia associato né all'aumento dell'affinità per il substrato a livello del suo sito attivo, né all'aumento del numero di molecole, suggerisce l'ipotesi che i campi elettromagnetici ad alta frequenza agiscano sul microambiente di membrana che circonda l'enzima, oppure potrebbero determinare cambiamenti delle condizioni all'interno della matrice lipidica, influenzando fortemente la sua attività.

Il presente lavoro quindi non fornisce risposte circa gli effetti del segnale GSM sulla salute umana, ma ci consente di affermare l'esistenza di un'interazione dei campi elettromagnetici con il modello biologico da noi utilizzato, richiamando l'attenzione sull'attività di questo enzima come possibile "indicatore" dell'interazione cellulare con tali segnali. Tale marcatore, ricercato da molti anni, non è mai stato individuato. Inoltre, sarà interessante valutare come l'effetto di aumento della V_{max} di reazione venga indotto in assenza di aumento dei trascritti genici.

Bibliografia

- Abhold RH, Ortner MJ, Galvin MJ, McRee DI. Studies on acute in vivo exposure of rats to 2450-MHz microwave radiation. II. Effects on thyroid and adrenal axes hormones. *Radiat Res.* 1981 Dec; 88(3):448-55.
- Abramov LN, Merkulova LM. [Histochemical study of the cholinesterase activity in the structures of the rat heart normally and during exposure to a pulsed electromagnetic field]. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1980 Nov;79(11):66-71.
- Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Mar;5(2):209-19.
- Atanasova E, Chiappa S, Wieben E, Brimijoin S. Novel messenger RNA and alternative promoter for murine acetylcholinesterase. *J Biol Chem.* 1999 Jul 23;274(30):21078-84.
- Bon S, Coussen F, Massoulié J. Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *J Biol Chem.* 1997 Jan 31;272(5):3016-21.
- Bourne Y, Taylor P, Radić Z, Marchot P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *EMBO J.* 2003 Jan 2;22(1):1-12.
- Capri M, Scarcella E, Fumelli C, Bianchi E, Salvioli S, Mesirca P, Agostini C, Antolini A, Schiavoni A, Castellani G, Bersani F, Franceschi C. In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential. *Radiat Res.* 2004 Aug;162(2):211-8.
- Chen VP, Xie HQ, Chan WK, Leung KW, Choi RC, Tsim KW. An induction effect of heat shock on the transcript of globular acetylcholinesterase in NG108-15 cells. *Chemico-Biological Interactions* 187 (2010) 106–109.
- Choi RC, Mok MK, Cheung AW, Siow NL, Xie HQ, Tsim KW. Regulation of PRiMA-linked G(4) AChE by a cAMP-dependent signaling pathway in cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem Biol Interact.* 2008 Sep 25;175(1-3):76-8.
- Clement MV, Long LH, Ramalingam J., Halliwell B. The cytotoxicity of dopamine may be an artefact of cell culture. *J. Neurochem.* 81: 414-421, 2002.

- _ Croft RJ, Leung S, McKenzie RJ, Loughran SP, Iskra S, Hamblin DL, Cooper NR. 2010. Effects of 2G and 3G mobile phones on human alpha rhythms: Resting EEG in adolescents, young adults, and the elderly. *Bioelectromagnetics* 31:434-444.
- _ Czyn J, Guan K, Zeng Q, Nikolova T, Meister A, Schönborn F, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. High frequency electromagnetic fields (GSM signals) affect gene expression levels in tumor suppressor p53-deficient embryonic stem cells. *Bioelectromagnetics*. 2004 May;25(4):296-307.
- _ D'Ambrosio G, Massa R, Scarfi MR, Zeni O. 2002. Cytogenetic damage in human lymphocytes following GSMK phase modulated microwave exposure. *Bioelectromagnetics* 23:7-13.
- _ David Hick, Danielle John, Natalia Z. Makova, Zaineb Henderson, Natalia N. Nalivaeva and Anthony J. Turner. Membrane targeting, shedding and protein interactions of brain acetylcholinesterase. *Journal of Neurochemistry*, 2011, 116, 742-746.
- _ Erik S. Schweitzer. Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. *Journal of Cell Science* 106, 731-740 (1993).
- _ Feng G, Krejci E, Molgo J, Cunningham JM, Massoulié J, Sanes JR. Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function. *J Cell Biol.* 1999 Mar 22;144(6):1349-60.
- _ Fornai F, Lenzi P, Lazzeri G, Ferrucci M, Fulceri F, Giorgi FS, Falleni A, Ruggieri S, Paparelli A. Fine ultrastructure and biochemistry of PC12 cells: a comparative approach to understand neurotoxicity. *Brain Res.* 2007 Jan 19;1129(1):174-90.
- _ Franzellitti S, Valbonesi P, Contin A, Biondi C, Fabbri E. HSP70 expression in human trophoblast cells exposed to different 1.8 Ghz mobile phone signals. *Radiat Res.* 2008 Oct;170(4):488-97.
- _ Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jul;73(7):2424-8.
- _ Grisar D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem.* 1999 Sep;264(3):672-86.

- _ Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Oct 1;90(19):9031-5.
- _ Hay Dvira,1, Israel Silmanb, Michal Harela, Terrone L. Rosenberryc, Joel L. Sussmana. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* 187 (2010) 10–22.
- _ Hicks D, John D, Makova NZ, Henderson Z, Nalivaeva NN, Turner AJ. Membrane targeting, shedding and protein interactions of brain acetylcholinesterase. *J Neurochem*. 2011 Mar;116(5):742-6.
- _ Hinrikus H, Bachmann M, Lass J, Tomson R, Tuulik V. Effect of 7, 14 and 21 Hz modulated 450 MHz microwave radiation on human electroencephalographic rhythms. *Int J Radiat Biol*. 2008 Jan;84(1):69-79.
- _ Höytö A, Luukkonen J, Juutilainen J, Naarala J. Proliferation, oxidative stress and cell death in cells exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and oxidants. *Radiat Res*. 2008 Aug;170(2):235-43. doi: 10.1667/RR1322.1.
- _ Huber R, Treyer V, Borbély AA, Schuderer J, Gottselig JM, Landolt HP, Werth E, Berthold T, Kuster N, Buck A, Achermann P. Electromagnetic fields, such as those from mobile phones, alter regional cerebral blood flow and sleep and waking EEG. *J Sleep Res*. 2002 Dec;11(4):289-95.
- _ Huber R, Treyer V, Schuderer J, Berthold T, Buck A, Kuster N, Landolt HP, Achermann P. Exposure to pulse-modulated radio frequency electromagnetic fields affects regional cerebral blood flow. *Eur J Neurosci*. 2005 Feb;21(4):1000-6.
- _ ICNIRP SCI Anthony J. Swerdlow, Maria Feychting, Adele C Green, Leeka Kheifets, David A Savitz. Mobile phones, brain tumours and the Interphone study: Where are we now? *Environ health perspect* 119(11):1534-1538; 2011.
- _ Israel Silman and Joel L Sussman. Acetylcholinesterase: ‘classical’ and ‘non-classical’ functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology* 2005, 5:293–302.
- _ Massoulie J, Bon S, Perrier N, Falasca C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-Biological Interactions* 157–158 (2005) 3–14.

- _ Jing P, Jin Q, Wu J, Zhang XJ. GSK3beta mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *J Neurochem.* 2008 Jan;104(2):409-19.
- _ Juutilainen J, Höytö A, Kumlin T, Naarala J. Review of possible modulation-dependent biological effects of radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics.* 2011 Oct;32(7):511-34. doi: 10.1002/bem.20652. Epub 2011 Apr 7.
- _ Krejci E, Coussen F, Duval N, Chatel JM, Legay C, Puype M, Vandekerckhove J, Cartaud J, Bon S, Massoulié J. Primary structure of a collagenic tail peptide of Torpedo acetylcholinesterase: co-expression with catalytic subunit induces the production of collagen-tailed forms in transfected cells. *EMBO J.* 1991 May;10(5):1285-93.
- _ Krejci E, Thomine S, Boschetti N, Legay C, Sketelj J, Massoulié J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J Biol Chem.* 1997 Sep 5;272(36):22840-7.
- _ Krokosz A, Szweda-Lewandowska Z. Changes in the activity of acetylcholinesterase and Na,K-ATPase in human erythrocytes irradiated with X-rays. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(3):471-8.
- _ Kunjilwar KK, Behari J. Effect of amplitude-modulated radio frequency radiation on cholinergic system of developing rats. *Brain Res.* 1993 Jan 22;601(1-2):321-4.
- _ Kunjilwar KK, Behari J. Effect of amplitude-modulated radio frequency radiation on cholinergic system of developing rats. *Brain Res.* 1993 Jan 22;601(1-2):321-4.
- _ Layer PG, Weikert T, Alber R. Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of a non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res.* 1993 Aug;273(2):219-26.
- _ Levey AI. Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* 1993;52(5-6):441-8.
- _ Li Y, Camp S, Taylor P. Tissue-specific expression and alternative mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene. *J Biol Chem.* 1993 Mar 15;268(8):5790-7.
- _ Lloyd A. Greene and Arthur S. Tischeler. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Cell Biology* 2424-2428.
- _ López-Granero, Canadas Perez, Fernando, Diana Cardona, Yu Yingchun, Giménez Estela, Lozano Rafael, Silva Avila Daiana, Aschner Michael, Sanchez-Santed

- Fernando. Chlorpyrifos Diisopropylphosphorofluoridate and Parathion-induced behavioral and oxidative stress effects: Are they mediated by analogous mechanisms of action? *Neurotoxicology* [122] 11-Sep-2012.
- _ Luukkonen J, Hakulinen P, Maki-Paakkanen J, Juutilainen J, Naarala J. 2009. Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872 MHz radiofrequency radiation. *Mutat Res* 662:54-58.
 - _ Malinger G, Zakut H, Soreq H. Cholinceptive properties of human primordial, preantral, and antral oocytes: in situ hybridization and biochemical evidence for expression of cholinesterase genes. *J Mol Neurosci.* 1989;1(2):77-84.
 - _ Markkanen A, Penttinen P, Naarala J, Pelkonen J, Sihvonen AP, Juutilainen J. Apoptosis induced by ultraviolet radiation is enhanced by amplitude modulated radiofrequency radiation in mutant yeast cells. *Bioelectromagnetics.* 2004 Feb;25(2):127-33.
 - _ Massoulié J, Bon S, Perrier N, Falasca C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem Biol Interact.* 2005 Dec 15;157-158:3-14.
 - _ Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S. Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact.* 2008 Sep 25;175(1-3):30-44.
 - _ Melega WP, Howard BD. Choline and acetylcholine metabolism in PC12 secretory cells. *Biochemistry.* 1981 Jul 21;20(15):4477-83.
 - _ Mesulam M, Geula C. Differential distribution of a neurofilament protein epitope in acetylcholinesterase-rich neurons of human cerebral neocortex. *Brain Res.* 1991 Mar 22;544(1):169-73.
 - _ Michaelson SM, Pettit S, Lu ST. Increased serum enzyme activity in microwave-exposed rats. *Radiat Res.* 1983 Oct;96(1):152-9.
 - _ Morelli A, Ravera S, Panfoli I, Pepe IM. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on membrane-associated enzymes. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Sep 15;441(2):191-8.
 - _ Moses GC, Martin AH. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on three plasma membrane-associated enzymes in early chicken embryos. *Biochem Int.* 1992 Dec;28(4):659-64.
 - _ Noel A, Perrier, Monica Salani, Cinzia Falasca, Suzanne Bon, Gabriella Augusti-Tocco and Jean Massoulié. The readthrough variant of acetylcholinesterase remains

- very minor after heat shock, organophosphate inhibition and stress, in cell culture and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 94, 629-638.
- _ Patocka J, Cabal J, Kuca K, Jun D. Oxime Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorous esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *J. Appl. Biomed.* 3:91-99, 2005.
 - _ Peng Jing, Qihuang Jinn, Jun Wu and Xue-Jun Zhang. GSK3 β mediates the induced expression of synaptic acetylcholinesterase during apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 2008, 104, 409-419.
 - _ Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. 2002 Jan 17;33(2):275-85
 - _ Perrier NA, Khérif S, Perrier AL, Dumas S, Mallet J, Massoulié J. Expression of PRiMA in the mouse brain: membrane anchoring and accumulation of 'tailed' acetylcholinesterase. *Eur J Neurosci*. 2003 Oct;18(7):1837-47.
 - _ Perrier NA, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulié J. Readthrough acetylcholinesterase expression remains minor after stress or exposure to inhibitors. *J Mol Neurosci*. 2006;30(1-2):75-6
 - _ Person BR, Salford LG, Burn A. 1997. Blood-brain barrier permeability in rat exposed to electromagnetic fields used in wireless communication. *Wireless Netw* 3:445-461.
 - _ Ravera S, Bianco B, Cugnoli C, Panfoli I, Calzia D, Morelli A, Pepe IM. Sinusoidal ELF magnetic fields affect acetylcholinesterase activity in cerebellum synaptosomal membranes. *Bioelectromagnetics*. 2010 May;31(4):270-6.
 - _ Regel SJ, Tinguely G, Schuderer J, Adam M, Kuster N, Landolt HP, Achermann P. Pulsed radio-frequency electromagnetic fields: dose-dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive performance. *J Sleep Res*. 2007 Sep;16(3):253-8.
 - _ Roger M. Lane, Steven G. Potkin and Albert Enz. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* (2006), 9, 101–124.
 - _ Roy C.Y. Choi, Mokka K.W. Mok, Anna W.H. Cheung, Nina L. Siow, Heidi Q. Xie, Karl W.K. Tsim. Regulation of PRiMA-linked G₄ AChE by a cAMP-dependent signaling pathway in cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chem Biol Interact*. 2008 Sep 25;175(1-3):76-8

- _ Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ber R, Bino T, Ariel N, Osman R, Velan B. Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. *EMBO J.* 1994 Aug 1;13(15):3448-55.
- _ Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol.* 2005 Jun;5(3):293-302.
- _ Silman, J.L. Sussman. Acetylcholinesterase: How is structure related to function. *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 3–10 2008.
- _ Silver A. *The Biology of cholinesterases*, North-Holland Reserch monographs, Amsterdam, 1974.
- _ Spratt KK. Transfection of PC12 cells: a model system for primary neuronal cells. *Quiagen News* 1998 Issue 4.
- _ Stian Ellefsen, Kare-Olav Stensløyken, Guro K. Sandvik a, Tom A. Kristensen, Goran E. Nilsson. Improved normalization of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction data using an external RNA control. *Analytical Biochemistry* 376 (2008) 83–93.
- _ Sussman JL, Harel M, Frolov F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* 1991 Aug 23;253(5022):872-9.
- _ Volpe P, Parasassi T, Esposito C, Ravagnan G, Giusti AM, Pasquarelli A, Eremenko T. Cell membrane lipid molecular dynamics in a solenoid versus a magnetically shielded room. *Bioelectromagnetics.* 1998;19(2):107-11.
- _ Vukova T, Atanassov A, Ivanov R, Radicheva N. Intensity-dependent effects of microwave electromagnetic fields on acetylcholinesterase activity and protein conformation in frog skeletal muscles. *Med Sci Monit.* 2005 Feb;11(2):BR50-6.
- _ Wan G, Yang K, Lim Q', Zhou L, He BP, Wong HK, Too HP. Identification and validation of reference genes for expression studies in a rat model of neuropathic pain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400 (2010) 575–580.
- _ Zhu LJ, Altmann SW. mRNA and 18S-RNA coapplication-reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Anal Biochem* 2005;345(1):102-9.

Sitografia e altre fonti:

- _ http://roma2.rm.ingv.it/tematiche/39/elettromagnetismo_ambientale/40/mecanismi_di_interazione_dei_campi_magnetici_con_i_tessuti_biologici;
- _ <http://www.ingv.it/it/>;
- _ <http://www.arpa.emr.it/>;
- _ <http://www.iss.it/elet/>;
- _ www.who.com;
- _ Bio-Rad. Real-time PCR Applications guide, 2006.
- _ D. Andreuccetti, M. Bini, A. Checcucci, A. Ignesti, L. Millanta, R. Olmi, N. Rubino. Protezione dai campi elettromagnetici non ionizzanti (3° Edizione, 2001)
- _ Elettra 2000. Cosa sono i campi elettromagnetici? Traduzione dall'originale "What are electromagnetic fields?" OMS;
- _ N. Ciancaglini, E. Fabbri, P. Valbonesi. Effetto dei campi elettromagnetici ad alta frequenza (segnale GSM) sull'attività e l'espressione dell'enzima acetilcolinesterasi in cellule PC12 in coltura, 2010;
- _ OMS, Organizzazione Mondiale della Sanità. Quadro per lo sviluppo di norme sanitarie sui campi elettromagnetici. Traduzione italiana del documento originale in inglese "Framework for Developing Health-Based EMF Standards", pubblicato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, 2006.