

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

Corso di Laurea Specialistica in
SCIENZE PER L'AMBIENTE ED IL TERRITORIO

**EFFETTO DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI AD ALTA
FREQUENZA (SEGNALE GSM) SULL'ATTIVITA' E
L'ESPRESSIONE DELL'ENZIMA
ACETILCOLINESTERASI IN CELLULE PC12 IN
CULTURA**

Tesi di Laurea in
C.I. di Fisiologia e Microbiologia Ambientale

Relatore

Prof. Elena Fabbri

Correlatore

D.ssa Paola Valbonesi

Presentata da
Nicola Ciancaglini

III sessione

Anno accademico 2008-2009

*“L’acquisto di qualunque cognizione è sempre utile allo intelletto,
perchè potrà scacciare da sè le cose inutili, e riservare le buone.
Perchè nessuna cosa si può amare nè odiare,
se prima non si ha cognizion di quella”*

Leonardo Da Vinci

INDICE

INTRODUZIONE	- 7 -
1. CENNI SULLA FISICA DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI	- 12 -
1.1 IL CAMPO ELETTRICO.....	- 12 -
1.2 LA CORRENTE ELETTRICA.....	- 13 -
1.3 IL CAMPO MAGNETICO.....	- 13 -
1.4 IL CAMPO ELETTROMAGNETICO.....	- 14 -
1.5 LO SPETTRO ELETTROMAGNETICO.....	- 17 -
1.6 SORGENTI DI CAMPI ELETTROMAGNETICI.....	- 20 -
2. EFFETTI BIOLOGICI DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI	- 21 -
2.1 EFFETTI BIOLOGICI E SANITARI.....	- 21 -
2.2 ESPOSIZIONE E DOSIMETRIA.....	- 24 -
2.2.1 Campi Elettromagnetici ad alta frequenza.....	- 25 -
2.2.2 Campi Elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF).....	- 28 -
2.3 STUDI SULL'ESPOSIZIONE A CAMPI ELETTROMAGNETICI.....	- 30 -
2.3.1 Studi sulle esposizioni a campi elettromagnetici a radiofrequenze (RF).....	- 31 -
a) Studi in vitro.....	- 31 -
b) Studi in vivo.....	- 33 -
c) Studi epidemiologici.....	- 34 -
2.3.2 Studi sulle esposizioni a campi a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF).....	- 36 -
a) Studi su sistemi in vitro ed in vivo.....	- 37 -
b) Studi epidemiologici.....	- 39 -
3. NORMATIVE E LINEE GUIDA PER L'ESPOSIZIONE A CAMPI ELETTROMAGNETICI NON IONIZZANTI	- 40 -
3.1 QUADRO DI RIFERIMENTO INTERNAZIONALE.....	- 40 -
3.2 QUADRO DI RIFERIMENTO DELLA COMUNITA' EUROPEA.....	- 44 -
3.3 NORMATIVA ITALIANA.....	- 47 -
3.4 NORMATIVA REGIONALE EMILIA-ROMAGNA.....	- 52 -
3.5 IL RUOLO DELL'ARPA EMILIA-ROMAGNA NEL MONITORAGGIO DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI.....	- 55 -
SCOPO DELLA TESI	- 57 -
4. SISTEMI BIOLOGICI DI STUDIO	- 59 -
4.1 IL RUOLO DELL'ACETILCOLINA (ACh) ALL'INTERNO DELLE SINAPSI CHIMICHE.....	- 59 -
4.2 L'ACETILCOLINESTERASI.....	- 63 -
4.2.1 Struttura Molecolare e Meccanismo di Funzionamento.....	- 63 -
4.2.2 Cinetica Enzimatica.....	- 67 -
4.2.3 Polimorfismi dell'Acetilcolinesterasi.....	- 69 -
4.2.4 Ruolo "non classico" dell'acetilcolinesterasi.....	- 72 -
4.2.5 L'acetilcolinesterasi come possibile bersaglio dei campi elettromagnetici.....	- 73 -
4.3 LA LINEA CELLULARE PC12.....	- 74 -
5. MATERIALI E METODI SPERIMENTALI	- 77 -
5.1 COLTURE CELLULARI.....	- 77 -
5.1.1 Congelamento delle cellule.....	- 78 -
5.1.2 Scongelo delle cellule.....	- 79 -
5.1.3 Mantenimento in linea delle cellule.....	- 79 -
5.1.4 Semina delle cellule per gli esperimenti.....	- 80 -
5.2 IL SISTEMA DI ESPOSIZIONE AI CAMPI ELETTROMAGNETICI.....	- 81 -
5.2.1 Modalità di Irraggiamento.....	- 84 -
5.2.2 Condizioni Sperimentali.....	- 85 -
5.3 METODI DI ANALISI.....	- 87 -
5.3.1 Preparazione del campione per il saggio di attività enzimatica.....	- 87 -
5.3.2 Determinazione della concentrazione di proteine.....	- 87 -
5.3.4 Saggio enzimatico per l'attività di AChE.....	- 89 -
5.3.5 Analisi dell'espressione proteica.....	- 90 -

a) Preparazione del campione per Western Blotting	- 90 -
b) Preparazione del gel per l'elettroforesi	- 91 -
c) Caricamento del campione per l'elettroforesi	- 92 -
d) Fase di Trasferimento (Blotting).....	- 93 -
e) Rivelazione Immunologica	- 95 -
5.3.6 Analisi dell'espressione genica.....	- 98 -
a) Estrazione dell'RNA totale	- 98 -
b) Retrotrascrizione	- 98 -
c) Reazione a catena della DNA Polimerasi (PCR)	- 100 -
d) Elettroforesi quantitativa su gel d'agarosio.....	- 104 -
5.4 TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI.....	- 107 -
6. RISULTATI	- 108 -
6.1 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DI AChE IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE A CAMPI ELETTROMAGNETICI AD ALTA FREQUENZA.....	- 108 -
6.1.1 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW	- 109 -
6.1.2 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz	- 110 -
6.1.3 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk.....	- 111 -
6.1.4 Valutazione della cinetica enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW	- 112 -
6.1.5 Valutazione della cinetica enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz	- 113 -
6.1.6 Valutazione della cinetica enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk.....	- 114 -
6.2 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA AChE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON FORSKOLIN	- 116 -
6.2.1 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE	- 117 -
6.2.2 Valutazione dell'espressione proteica di AChE	- 118 -
6.2.3 Valutazione dell'espressione genica di AChE.....	- 119 -
6.3 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DI AChE	- 120 -
6.3.1 Valutazione dell'espressione proteica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW	- 120 -
6.3.2 Valutazione dell'espressione proteica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz	- 122 -
6.3.3 Valutazione dell'espressione proteica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk.....	- 123 -
6.4 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI AChE.....	- 124 -
6.4.1 Valutazione dell'espressione genica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW	- 124 -
6.4.2 Valutazione dell'espressione genica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz	- 126 -
6.4.3 Valutazione dell'espressione genica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk.....	- 127 -
7. DISCUSSIONE	- 128 -
8. CONCLUSIONI	- 133 -
BIBLIOGRAFIA	- 134 -
RINGRAZIAMENTI	- 143 -

INTRODUZIONE

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. Anche l'intensificazione della rete di trasmissione elettrica, conseguente all'aumento della richiesta di energia elettrica, nonché l'urbanizzazione di territori precedentemente disabitati e caratterizzati dalla presenza di elettrodotti o di emittenti radiotelevisive, hanno contribuito a destare perplessità circa i possibili effetti sulla salute derivanti dalla permanenza prolungata in prossimità di tali installazioni. Durante il ventesimo secolo, l'esposizione ambientale a campi elettromagnetici di origine umana è costantemente aumentata in quanto la crescita della domanda di elettricità, il continuo avanzamento delle tecnologie ed i cambiamenti nei comportamenti sociali hanno creato sorgenti artificiali in misura sempre maggiore. Ognuno è esposto, sia in casa sia sul posto di lavoro, a una complessa miscela di deboli campi elettrici e magnetici dovuti alla generazione e al trasporto di elettricità, agli elettrodomestici, agli apparati industriali, alle telecomunicazioni e all'emittenza radiotelevisiva. Il fenomeno comunemente definito "*inquinamento elettromagnetico*" è legato alla generazione di campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici artificiali, cioè non attribuibili al naturale fondo terrestre o ad eventi naturali (quale ad esempio può essere il campo elettrico generato da un fulmine), ma prodotti da impianti realizzati per trasmettere informazioni attraverso la propagazione di onde elettromagnetiche (impianti radio-TV e per telefonia mobile), da impianti utilizzati per il trasporto e la trasformazione dell'energia elettrica dalle centrali di produzione fino all'utilizzatore in ambiente urbano (elettrodotti), da apparati per applicazioni biomedicali, da impianti per lavorazioni industriali, nonché da tutti quei dispositivi il cui funzionamento è subordinato a un'alimentazione di rete elettrica (tipico esempio sono gli elettrodomestici). Mentre i sistemi di teleradiocomunicazione (impianti radio-TV, telefonia mobile) sono appositamente progettati e costruiti per emettere onde elettromagnetiche (irradiatori intenzionali), le quali sono alla base della trasmissione delle informazioni (audio, video, etc.), gli impianti di trasporto, di trasformazione (elettrodotti) e gli utilizzatori di energia elettrica emettono invece nell'ambiente circostante campi elettrici e magnetici in maniera non intenzionale, ma come conseguenza diretta e inevitabile del loro funzionamento basato sul trasporto e quindi sulla

presenza e movimento di carica elettrica. Infatti, una carica elettrica genera una modificazione dello spazio ad essa circostante tale che, se un'altra carica elettrica viene posta in tale spazio, risente di una forza che può essere attrattiva o repulsiva. Analogamente una corrente elettrica, che è generata da cariche in movimento, produce una modificazione dello spazio circostante: il campo magnetico. Campi elettrici o magnetici rapidamente variabili nel tempo non rimangono fra loro disaccoppiati: l'uno dà origine all'altro e, in sostanza, ambedue coesistono in un'entità unica a cui si dà il nome di *campo elettromagnetico*. Inoltre, il campo elettromagnetico non può restare immobile in una regione dello spazio. Come risultato dei processi di mutua generazione suddetti, il campo elettromagnetico deve propagarsi, allontanandosi dalla sorgente da cui trae origine. In questo modo si capisce come le persone siano continuamente esposte a campi elettromagnetici, indipendentemente dal fatto che si tratti di un'esposizione di tipo professionale o di tipo civile, ovunque siano presenti sorgenti di elettricità sono presenti anche campi elettromagnetici. L'esposizione a campi può provocare diversi effetti biologici con una varietà di conseguenze per gli esseri umani. Essi interagiscono con le cariche elettriche presenti nel corpo umano esercitando forze su di esse, e quindi provocano sempre in qualche misura una risposta, che può tradursi in un effetto biologico. Questo non implica necessariamente un effetto di danno alla salute. Alcuni effetti biologici possono non avere alcuna conseguenza nota, nociva o benefica; altri possono portare a malattie, altri ancora avere conseguenze benefiche. Gli effetti di disturbo o di disagio possono non essere patologici di per sé ma, se accertati, possono compromettere il benessere fisico e mentale di una persona e l'effetto che ne risulta deve essere considerato come un potenziale danno per la salute.

Nonostante i potenziali effetti dei campi elettromagnetici artificiali siano argomento di interesse scientifico sin dalla fine dell'800 essi hanno ricevuto particolare interesse negli ultimi 40 anni. Uno sguardo ai titoli giornalistici degli ultimi anni fornisce un'idea delle diverse aree di preoccupazione da parte dell'opinione pubblica. Nel corso dell'ultimo decennio, interrogativi per la salute sono stati sollevati a proposito di numerose sorgenti di campi elettromagnetici, tra cui appunto le linee elettriche, forni a microonde, schermi di computer e televisori, sistemi di sicurezza, radar, e più recentemente, telefoni mobili e relative stazioni radio base. In risposta ai crescenti interrogativi su possibili effetti sanitari delle sorgenti di campi elettromagnetici, il cui numero e la cui varietà vanno continuamente aumentando, sono richiesti sempre più studi volti a migliorare le conoscenze in questo ambito. Negli ultimi 30 anni, sono stati pubblicati circa 25.000

articoli scientifici nel settore degli effetti biologici e delle applicazioni mediche delle radiazioni non ionizzanti e le conoscenze in questo campo sono oggi più ampie che per la maggior parte degli agenti chimici, tuttavia esistono ampie lacune che richiedono ulteriori ricerche.

Per questo motivo istituti di ricerca, enti privati e pubblici, Università, organizzazioni governative e non governative di tutto il mondo svolgono attività di ricerca in questo settore, al fine di concretizzare risultati affidabili sugli effetti biologici dei campi elettromagnetici come prerogativa fondamentale per la protezione della salute umana.

Nel maggio 1996, in risposta alle crescenti preoccupazioni per i possibili effetti sanitari dell'esposizione a sorgenti di campi elettromagnetici l'*Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)* ha avviato un progetto internazionale per valutare gli effetti sanitari ed ambientali dell'esposizione a campi elettrici e magnetici, che è noto come Progetto Internazionale CEM. Questo progetto intende unificare le conoscenze e le risorse disponibili delle principali organizzazioni e istituzioni scientifiche internazionali, allo scopo di arrivare a raccomandazioni scientificamente fondate per la definizione dei rischi sanitari dell'esposizione ai campi elettromagnetici variabili nell'intervallo 0-300 GHz. Un ente fondamentale di consulenza scientifica in questo settore è l' ICNIRP (Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni non Ionizzanti), un gruppo indipendente di esperti, che è stato costituito per valutare lo stato delle conoscenze relative agli effetti delle radiazioni non ionizzanti, ivi compresa l'emanazione di linee guida per la limitazione delle esposizioni. Questi sono solo alcuni esempi di organizzazioni che lavorano nel settore degli effetti biologici e sanitari dei campi elettromagnetici e che rappresentano riferimenti importanti per tutti gli enti ed istituti di tipo nazionale che si occupano di questi problemi, a partire dall'NRPB in Gran Bretagna, l'SSI in Svezia, l'ISS o l'ISPRa in Italia e via di seguito verso enti locali ed Università.

Gli studi sugli effetti biologici e sanitari dei campi elettromagnetici devono essere svolti da più punti di vista al fine di avere una visione complessiva del problema in esame. Per poter valutare i potenziali effetti nocivi dei campi elettromagnetici è necessaria una combinazione di studi, in aree di ricerca diverse. I differenti tipi di studio indagano diversi aspetti del problema:

- le *ricerche di laboratorio su sistemi cellulari*, che mirano a chiarire i meccanismi molecolari fondamentali sottostanti ad un eventuale collegamento tra esposizione a campi elettromagnetici ed effetti biologici.

- gli *studi su animali*, che sono più strettamente collegati a situazioni di vita reale e forniscono dati di più diretta rilevanza per poter stabilire dei livelli di esposizione sicura per l'uomo.

- gli *studi epidemiologici*, ovvero gli studi sull'uomo che indagano cause di distribuzioni delle patologie in situazioni di vita reale, entro date comunità e gruppi professionali.

Per queste ragioni, quando devono essere prese decisioni su eventuali rischi per la salute, gli scienziati e i rispettivi governi cui fanno riferimento devono valutare tutti i dati significativi, sia quelli derivanti da studi su cellule che quelli su animali ed integrare i suddetti con gli studi epidemiologici svolti sull'uomo. Tuttavia, trovare un'associazione tra un certo agente e una specifica patologia non significa necessariamente che il primo abbia causato la seconda. L'ipotesi di una relazione causa-effetto è rafforzata se esiste una forte associazione tra esposizione ed effetto, una chiara relazione dose-risposta o il sostegno di pertinenti studi e la coerenza tra loro. Tali fattori sono in genere risultati assenti negli studi che riguardavano i campi elettromagnetici. Questa è una delle ragioni più forti per le quali gli scienziati sono generalmente riluttanti a concludere che deboli campi elettromagnetici provochino degli effetti sanitari.

“Non c'è nessuna evidenza convincente di un effetto nocivo dei campi elettromagnetici”, oppure *“Non è stata confermata una relazione di causa ed effetto tra campi elettromagnetici e cancro”* sono esempi tipici delle conclusioni raggiunte dai comitati di esperti che hanno analizzato il problema. Ma perchè la ricerca dovrebbe continuare se gli scienziati hanno già mostrato che non c'è alcun effetto?

La risposta a questo interrogativo risulta piuttosto semplice: gli studi sull'uomo sono ottimi per identificare grandi effetti, come la connessione tra fumo e cancro. Purtroppo, sono molto meno in grado di distinguere un piccolo effetto dalla mancanza di effetti. Se i campi elettromagnetici, ai tipici livelli ambientali, fossero potenti cancerogeni, sarebbe stato molto facile dimostrarlo. E' però molto più difficile dimostrare se i campi elettromagnetici di bassa intensità sono un debole cancerogeno, o se sono un potente cancerogeno ma solo per un piccolo gruppo di persone all'interno di una comunità più vasta. Infatti, anche nel caso in cui uno studio di ampie proporzioni non mostri alcuna associazione, non potremo mai essere del tutto sicuri che non esista nessuna relazione. L'assenza di un effetto potrebbe significare che effettivamente non ne esiste alcuno, ma potrebbe altrettanto significare che l'effetto è semplicemente non rivelabile con quel particolare metodo di misura. Quindi, i risultati negativi sono generalmente meno

convincenti di quelli fortemente positivi. Per questo motivo la ricerca scientifica va avanti quotidianamente in questo campo di studi, al fine di ottimizzare i criteri di analisi, produrre dati di una certa attendibilità e sviluppare linee guida per la protezione della popolazione basate su una robusta rilevanza scientifica.

1. CENNI SULLA FISICA DEI CAMPI ELETTRICI

1.1 IL CAMPO ELETTRICO

Le *cariche elettriche* sono presenti in natura in due specie diverse, che vengono contraddistinte con i nomi di carica *positiva* e carica *negativa*. La carica elettrica si misura in *coulomb*. Le cariche di ugual segno si respingono e quelle di segno opposto si attraggono. Un modo conveniente di fornire una descrizione quantitativa di questo fenomeno è quello di dire che fra le cariche elettriche si esercita una *forza*.

Consideriamo due corpi di dimensioni piccolissime (oggetti puntiformi), come rappresentati in Figura 1.1, localizzati in P_1 e P_2 , separati dalla distanza r e dotati di carica q_1 e q_2 :

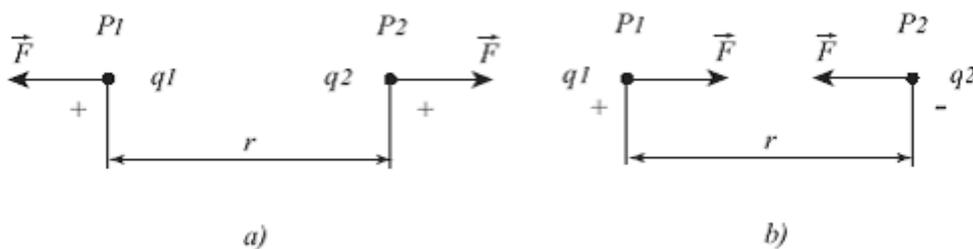


Figura 1.1 Forza tra due cariche puntiformi q_1 e q_2 separate dalla distanza r (a) cariche di egual segno; (b) cariche di segno opposto.

Su ciascuno dei due corpi risulta applicata una *forza*, diretta secondo la congiungente i due punti e la cui intensità è data dalla formula qui di seguito riportata dove ϵ_0 è una costante, detta *costante dielettrica del vuoto* (vale $8.854 \cdot 10^{-12}$ F/m), e la presenza di $\pi = 3.1415\dots$ deriva dal sistema di unità di misura. In sostanza, la forza è tanto più intensa quanto è più elevato il valore delle cariche (prodotto $q_1 q_2$) e diminuisce con la loro distanza (inversamente proporzionale a r^2):

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2} \quad (\text{legge di Coulomb})$$

È utile introdurre un punto di vista un po' diverso per rappresentare i fenomeni descritti. Si è dimostrato più efficace nel rappresentare la realtà, dire che a causa della presenza delle

cariche, lo spazio è divenuto sede di un campo di forze; il che, in sostanza, significa che se una carica q viene posta in tale zona di spazio essa è soggetta ad una forza. Il valore della forza nei vari punti del campo è ovviamente calcolabile con le regole già esposte e risulta proporzionale alla carica q medesima. Grazie a questa proporzionalità, ci si può svincolare dal valore particolare q della carica su cui la forza si manifesta, introducendo la quantità "forza per unità di carica", a cui si dà il nome di *campo elettrico* e si indica comunemente con il simbolo \vec{E} . Se indichiamo con \vec{F} la forza esercitata sulla carica q , \vec{E} risulta pertanto definito da:

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

La specificazione del valore di \vec{E} in ogni punto della regione di interesse è pertanto sufficiente a descrivere il campo di forze. L'unità di misura più comunemente utilizzata per descrivere il campo elettrico è il V/m (Volt su metro).

1.2 LA CORRENTE ELETTRICA

Un flusso ordinato di cariche elettriche costituisce una *corrente elettrica*. Per convenzione, la corrente scorre nel verso in cui si muovono le *cariche positive*; nel caso di cariche negative, pertanto, il verso della corrente è opposto al moto delle cariche. L'intensità della corrente è riferita ad una certa superficie ed è data, per definizione, dalla carica che attraversa quella superficie nell'unità di tempo. Ovvero, se Δq è la quantità di carica che attraversa la data superficie nel tempo Δt , la corrente i è espressa dal rapporto:

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

1.3 IL CAMPO MAGNETICO

Le cariche elettriche producono un campo elettrico nello spazio ad esse circostante. Quando le cariche elettriche sono in movimento (o in altre parole, quando è presente una corrente elettrica) esse danno origine anche ad un *campo magnetico*. Per cui il campo magnetico H è una regione di spazio estesa intorno ad un oggetto percorso da corrente elettrica, detto sorgente di campo, nella quale si manifestano forze su altri oggetti percorsi da corrente elettrica.

Tutti i corpi che vengono posti sotto l'influenza di un campo magnetico esterno si magnetizzano. L'effetto dello stesso campo magnetico è però diverso in funzione del materiale che si desidera magnetizzare. Un campo magnetico è tanto più intenso quanto più è elevato il vettore di induzione, detto vettore *induzione magnetica* (\vec{B}), la cui intensità nel S.I si misura in Tesla [T]: un Tesla è un campo \vec{B} tale che una carica di un C, in moto con velocità (v) di un m/s, è soggetta alla 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:

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

- μ è la permeabilità magnetica del mezzo.

Questo significa che in vari materiali, anche se sottoposti tutti allo stesso campo magnetico \vec{H} , si genera un'induzione di valore diverso. Per paragonare i vari materiali tra di loro, è necessario poter disporre di un coefficiente μ di confronto, ed è stato preso quello del vuoto, denominato μ_0 . Il valore μ del materiale è dato dall'equazione:

$$\mu = \mu_0 \cdot \mu_r$$

- μ_0 è la permeabilità magnetica del vuoto, $4 \cdot \pi \cdot 10^{-7} \cong 1,25664 \cdot 10^{-6}$ H/m,

- μ_r permeabilità magnetica relativa del materiale.

1.4 IL CAMPO ELETTROMAGNETICO

Quando il campo elettrico e il campo magnetico generati da cariche elettriche in movimento variano nel tempo, nascono importanti fenomeni di interazione tra di essi. Campi elettrici o magnetici rapidamente variabili non rimangono quindi tra loro disaccoppiati: un campo elettrico variabile genera, in direzione perpendicolare a se stesso, un campo magnetico variabile che, a sua volta, produce un campo elettrico variabile e, in sostanza, ambedue esistono in un'entità unica a cui si dà il nome di *campo elettromagnetico (CEM)*. Il campo elettromagnetico ha origine dunque da un'interazione dinamica tra campo elettrico e campo magnetico, i quali si sviluppano perpendicolarmente sia l'uno rispetto all'altro che rispetto alla direzione di propagazione.

Campi elettromagnetici prodotti da cariche oscillanti di moto armonico, si propagano ad elevate distanze dalla sorgente sotto forma di un'onda sinusoidale, e per questi motivi come tutti i fenomeni oscillatori, possono essere descritti dalle comuni grandezze fisiche che caratterizzano la propagazione di un'onda.

Le caratteristiche di un'onda elettromagnetica vengono sintetizzate principalmente utilizzando la *frequenza* (ν) e la *lunghezza d'onda* (λ). La frequenza rappresenta il numero di periodi che l'onda compie nell'unità di tempo. Il *periodo* (T) rappresenta il tempo che l'onda impiega per compiere un'oscillazione completa e tornare alla condizione iniziale. La frequenza e il periodo sono legati dalla relazione:

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

Il periodo si misura in secondi (s), mentre la frequenza si misura in Hertz (Hz) ossia s^{-1} . La lunghezza d'onda invece rappresenta la distanza tra punti equivalenti di una forma d'onda, e cioè la distanza tra due massimi o due minimi dell'oscillazione (anche detti *creste* o *valli*). La lunghezza d'onda si misura in metri (m).

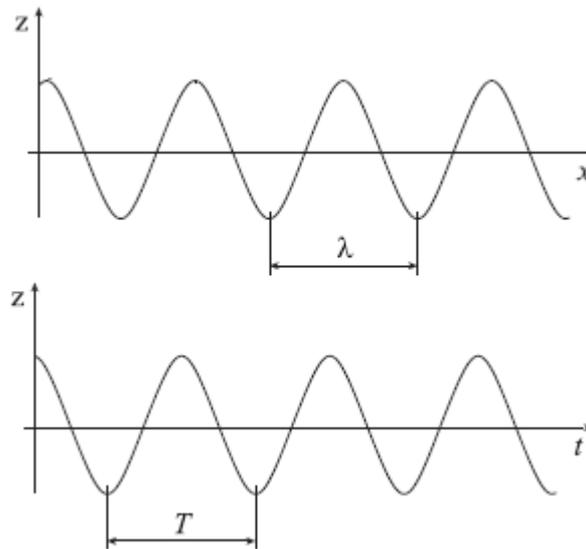


Figura 1.2 Rappresentazione della propagazione del moto oscillatorio nello spazio e nel tempo.

Tra frequenza e lunghezza d'onda esiste una relazione fondamentale per la descrizione dei fenomeni ondulatori:

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

dove c nel caso della radiazione elettromagnetica nel vuoto è la velocità della luce e vale 299.792,458 Km/s (che si approssima di solito a 300.000 Km/s). Questa è una relazione fondamentale perchè stabilisce una proporzionalità inversa tra frequenza e lunghezza d'onda di una radiazione elettromagnetica, per cui al crescere della frequenza diminuisce la

rispettiva lunghezza d'onda. Dato che la frequenza è inoltre legata all'energia E per mezzo della nota equazione di Plank ($E = h \nu$, con $h = 6,626 \times 10^{-34}$ J s), si capisce come l'energia di una radiazione elettromagnetica aumenti all'aumentare della sua frequenza e al diminuire della sua lunghezza d'onda. La classificazione delle onde elettromagnetiche fatta mediante ν , λ , o E rappresenta quello che comunemente viene chiamato *spettro elettromagnetico*, di cui parleremo più avanti in questa tesi.

Nelle immediate vicinanze di una sorgente (antenna, elettrodotto, elettrodomestico), il campo elettrico ed il campo magnetico sono del tutto indipendenti uno dall'altro, essendo legati e determinati dalle rispettive "sorgenti fisiche" (cariche e correnti); essi perciò non possono essere ricavati uno dall'altro e devono essere valutati separatamente. Siamo nella zona detta dei *campi vicini*, che a sua volta si divide in altre due regioni: dei *campi reattivi* e la regione di *Fresnel*.

La *regione dei campi reattivi* si trova nelle immediate vicinanze della sorgente e fino ad una distanza di circa 1/10 della lunghezza d'onda (λ). In questa regione i campi pur essendo variabili nel tempo, si comportano come campi statici visto che sono trascurabili le componenti di mutua generazione rispetto a quelle dovute alle sorgenti fisiche, per cui siamo in regime quasi statico. In questa regione l'energia non abbandona la sorgente ma viene emessa e riassorbita dal generatore ogni quarto di periodo; quindi non c'è trasporto di potenza e le intensità dei campi elettrico e magnetico si attenuano rapidamente con la distanza dalla sorgente assumendo significato solo in prossimità dell'emettitore.

La zona di campo vicino è la più critica per quanto riguarda la protezione elettromagnetica, l'intensità dei campi si attenua in modo inversamente proporzionale al cubo della distanza dalla sorgente e in prossimità di questa si presentano valori più elevati di campo elettrico e di campo magnetico.

La *regione di Fresnel* costituisce una sorta di zona d'intersezione fra i campi reattivi e i campi lontani, si trova ad una distanza dalla sorgente circa uguale alla lunghezza d'onda (λ). In questa regione avviene trasporto di potenza ma non esiste alcuna relazione semplice tra il campo elettrico e il campo magnetico. E' la zona in cui si comincia a formare il fascio di radiazione per le antenne a grande apertura e i campi vanno misurati separatamente.

Allontanandosi dalla sorgente, la struttura dei campi inizia a risentire del fenomeno della radiazione (zona dei *campi lontani*) che resta l'unico significativo a distanze dalla sorgente superiori al valore della lunghezza d'onda; questo fenomeno consiste nella mutua generazione fra campo elettrico e campo magnetico variabili nel tempo: ha senso allora

parlare di onda elettromagnetica. I *campi lontani* o *zona di Fraunhofer* comprendono un'unica regione quella dei *campi radiativi* che si trova a distanze dalla sorgente maggiori di $1/10$ della lunghezza d'onda (λ). Il campo lontano si attenua lentamente e la sua intensità è inversamente proporzionale alla distanza. La figura 1.3 di seguito riportata, mostra una tipica rappresentazione del fenomeno generato dalla propagazione di un'onda elettromagnetica:

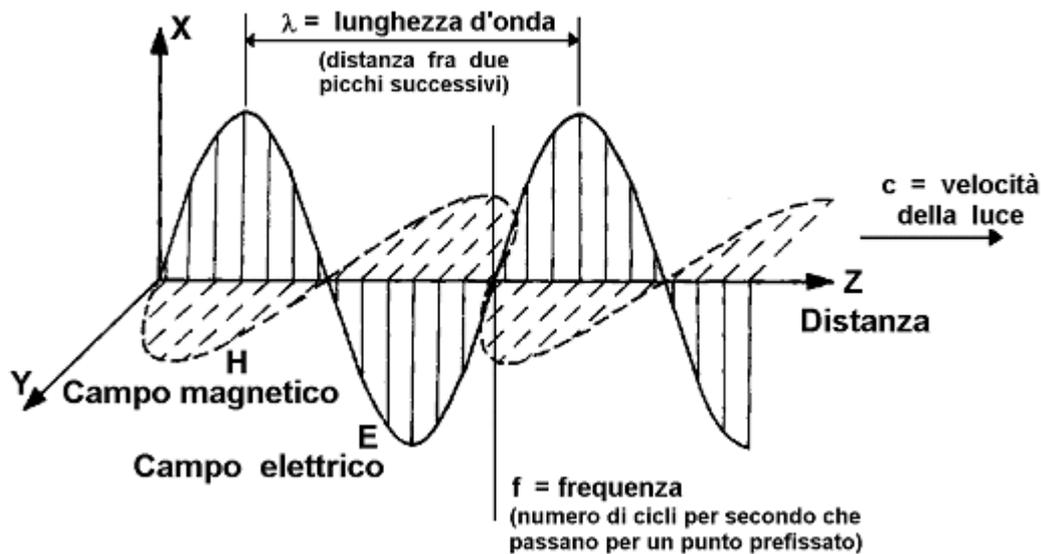


Figura 1.3 Rappresentazione di un'onda elettromagnetica.

1.5 LO SPETTRO ELETTROMAGNETICO

Le onde elettromagnetiche vengono classificate secondo la frequenza e la lunghezza d'onda. Sulla base di questi parametri viene comunemente fatta una suddivisione delle varie categorie di onde che nel linguaggio comune prende il nome di *spettro elettromagnetico*. In base a frequenza o lunghezza d'onda lo spettro varia da onde a frequenza molto basse (e conseguentemente a lunghezza d'onda molto elevate), come quelle utilizzate negli elettrodomesti o nella telefonia fissa, a quelle a frequenze più elevate come le radiofrequenze, microonde, infrarosso, visibile e ultravioletto, per poi concludersi con le radiazioni a frequenza altissima come raggi X e gamma.

Da un'analisi più attenta, emerge che all'interno dello spettro esiste una distinzione importante che divide le onde elettromagnetiche in due grandi famiglie, distinzione che diventa fondamentale soprattutto in tema di effetti biologici e sanitari:

- **radiazioni ionizzanti**, tutte quelle radiazioni elettromagnetiche con un'energia

fotonica superiore a 12 eV, 100 nm di lunghezza d'onda e $3 \cdot 10^{15}$ Hz di frequenza. Le radiazioni ionizzanti (come raggi X e raggi γ , nonché radiazioni cosmiche) sono per definizione dotate di un'energia talmente alta da riuscire a rompere i legami atomici tra le molecole che costituiscono la materia vivente, generando il fenomeno della ionizzazione.

- **radiazioni non ionizzanti (NIR)**, tutte quelle radiazioni elettromagnetiche con una energia fotonica inferiore a 12 eV, 100 nm di lunghezza d'onda e $3 \cdot 10^{15}$ Hz di frequenza. Le radiazioni non ionizzanti non hanno energia sufficientemente alta da rompere i legami tra le molecole, tuttavia possono interagire con la materia vivente apportando modifiche termiche, meccaniche e bioelettriche. Di questa classe fanno parte per esempio i *campi a bassissima frequenza* (elettrodotti) i *campi a radiofrequenza (RF)*, le *microonde* (telefonia mobile, stazioni radio-base, emittenti radio-televisive), il *vicino ultravioletto*, il *visibile* e l'*infrarosso (IR)*.

Viene di seguito riportata in figura 1.4 una rappresentazione dello spettro elettromagnetico e la rispettiva classificazione e denominazione dello stesso sulla base di frequenza e lunghezza d'onda (tab. 1):

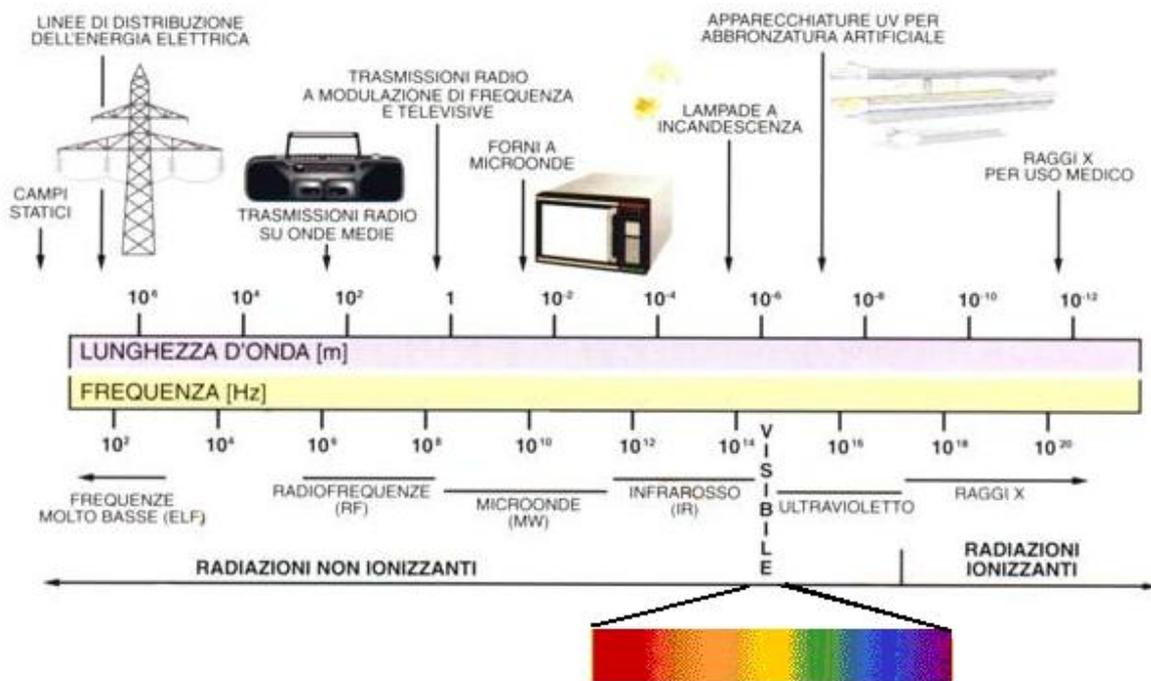


Figura 1.4 Rappresentazione dello spettro elettromagnetico.

Tabella 1 – Classificazione e denominazione delle frequenze elettromagnetiche.

Denominazione		Sigla	Frequenza [f]	Lunghezza d'onda [λ]
Extremely Low Frequency		ELF	0 Hz – 3 kHz	> 100 km
Very Low Frequency (onde lunghissime)		VLF	3 – 30 kHz	100 – 10 km
RADIOFREQUENZE	Low Frequency (onde lunghe)	LF	30 – 300 kHz	10 – 1 km
	Medium Frequency (onde medie)	MF	300 kHz – 3 MHz	1 km – 100 m
	High Frequency (onde corte)	HF	3 – 30 MHz	100 – 10 m
	Very High Frequency (onde metriche)	VHF	30 – 300 MHz	10 – 1 m
MICROONDE	Ultra High Frequency (onde decimetriche)	UHF	300 MHz – 3 GHz	1000 – 100 mm
	Super High Frequency (onde centimetriche)	SHF	3 – 30 GHz	100 – 10 mm
	Extremely High Frequency (onde millimetriche)	EHF	30 – 300 GHz	10 – 1 mm
INFRAROSSO		IR	0,3 – 385 THz	1000 – 0,78 μm
LUCE VISIBILE			385 – 750 THz	780 – 400 nm
ULTRAVIOLETTO		UV	750 – 3000 THz	400 – 100 nm
RAGGI X			3 – 3000 PHz	100 – 0,1 nm
RAGGI γ			Oltre 3 EHz	< 0,1 nm

1.6 SORGENTI DI CAMPI ELETTROMAGNETICI

I campi elettromagnetici sono presenti ovunque nel nostro ambiente di vita, ma sono invisibili all'occhio umano (tranne nell'intervallo della luce visibile). E' opinione comune che l'insieme dei campi elettromagnetici a cui quotidianamente siamo esposti siano esclusivamente di derivazione artificiale, ossia prodotti dalla vasta gamma di processi tecnologici generati dalla continua innovazione in ambito tecnico e scientifico. Tuttavia i campi elettromagnetici esistono in natura, e l'opera dell'uomo non ha fatto altro che incrementare notevolmente un fondo naturale che ha sempre caratterizzato la vita sul nostro pianeta. Per questo motivo quando si parla di *sorgenti di campi elettromagnetici* bisogna distinguere innanzitutto tra:

1. sorgenti naturali

2. sorgenti artificiali

Tra le sorgenti naturali di campi elettromagnetici troviamo in primis la radiazione luminosa proveniente dal sole, che quotidianamente irraggia la superficie del pianeta, fornendo così l'energia fondamentale per la regolazione di tutti i meccanismi alla base della vita. Il campo magnetico terrestre, prodotto da cariche elettriche che circolano all'interno degli strati profondi della terra, che fa sì che l'ago di una bussola si orienti nella direzione nord-sud e che uccelli e pesci lo utilizzino come riferimento per i loro spostamenti. Le scariche elettriche dovute a fenomeni atmosferici che si generano durante i temporali a causa dell'elevato accumulo di cariche elettriche nell'atmosfera.

Per quel che riguarda le sorgenti artificiali di campi elettromagnetici basta pensare a qualsiasi attività umana che richiede l'utilizzo di elettricità. Naturalmente in dipendenza del tipo di applicazione i campi elettromagnetici saranno diversi in energia e frequenza. Tra le sorgenti più comuni si annoverano le linee e gli impianti per il trasporto e la distribuzione dell'energia elettrica (elettrodotti), gli impianti per le telecomunicazioni radio-televisive, la telefonia mobile e le rispettive stazioni radio-base, l'utilizzo di apparecchiature elettriche sia in ambito abitativo che lavorativo, l'impiego di radar, i dispositivi militari e i sistemi di sicurezza. In ultimo, ma non per questo meno importanti, le radiazioni prodotte per scopi terapeutici in ambito medico, quali la radioterapia, i raggi X ed i laser.

2. EFFETTI BIOLOGICI DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI

Gli organismi viventi, esposti a campi elettromagnetici, interagiscono con questi assorbendone energia, con meccanismi analoghi a quelli che hanno luogo nell'interazione con un qualsiasi altro oggetto materiale. Il meccanismo attraverso il quale questa interazione si attua è costituito dalle forze esercitate dal campo elettrico e dal campo magnetico sulle cariche elettriche presenti nel sistema materiale (nel nostro caso il corpo umano, un tessuto o una cellula). Pertanto relativamente a questa interazione, la materia può essere considerata come un enorme aggregato di particelle portatrici di *carica elettrica*. Per questo motivo, è ineludibile una risposta all'inquietante interrogativo se, e in quale misura, l'esposizione a tali campi elettromagnetici possa costituire un rischio per la salute. A tal proposito sono necessari seri programmi di indagine per giungere alla formulazione di criteri protezionistici validi.

2.1 EFFETTI BIOLOGICI E SANITARI

E' di fondamentale importanza definire correttamente il significato di alcuni termini utilizzati generalmente nella letteratura protezionistica, al fine di evidenziare le distinzioni e non incorrere in inutili allarmismi. In particolare, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha posto più volte l'accento sulla distinzione tra *interazione*, *effetto biologico*, ed *effetto di danno alla salute (effetto sanitario)*:

1. un' *interazione* è la possibilità che un'onda elettromagnetica venga a contatto con le componenti atomiche e molecolari di un sistema biologico. Quando un organismo interagisce con una radiazione elettromagnetica, il suo equilibrio elettrico viene sicuramente perturbato, senza che ciò si traduca automaticamente in un effetto biologico apprezzabile e tanto meno in un danno.
2. un *effetto biologico* si verifica quando l'esposizione ad onde elettromagnetiche provoca qualche variazione fisiologica notevole o rilevabile in un sistema biologico.
3. un *effetto di danno alla salute (effetto sanitario)* 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, cioè del benessere fisico, mentale e socio-comportamentale dell'organismo. Per cui è di

notevole importanza capire che il verificarsi di un effetto biologico non significa necessariamente lo sviluppo di un danno alla salute.

Secondo un modello semplice, ma utile, un effetto biologico può essere il risultato di un processo *deterministico* o *stocastico*:

- in un processo *deterministico* l'entità dell'effetto è legata al livello di esposizione, cioè alla dose, e se ne può definire una soglia.
- in un processo *stocastico*, al contrario, l'esposizione determina la probabilità che un certo evento (l'effetto biologico) si verifichi, ma non l'entità dell'effetto. In pratica sono effetti probabilistici legati al fatto di essere esposti o no alla dose.

In linea di principio, questa distinzione richiede una comprensione dei meccanismi sottostanti. E' quindi importante distinguere risposte che presentano una *soglia* (cioè, i casi in cui, affinché un effetto si verifichi, bisogna somministrare una quantità minima della grandezza che può indurre un effetto) da altre che non la presentano. Inoltre, vari processi di riparazione e di protezione possono eliminare o mitigare notevolmente qualunque effetto dell'esposizione; questi processi possono verificarsi a livello molecolare, cellulare, di organo o di organismo intero (ICNIRP Review).

La linea di demarcazione tra effetto biologico ed effetto di danno alla salute è netta, in quanto il primo può tradursi nel secondo, ma nella maggior parte dei casi la transizione dall'uno all'altro non è così immediata, infatti l'effetto di danno alla salute rappresenta lo stadio ultimo e più importante dell'interazione con agenti esterni. Inoltre, e questa rappresenta una delle problematiche più consistenti degli effetti da campi elettromagnetici, possibili patologie possono svilupparsi anche in un tempo molto lontano dall'esposizione. Per questo motivo per gli effetti sanitari spesso si distingue tra:

- *a breve termine o immediati*, di natura acuta e deterministica, effetto con presenza di soglia di esposizione;
- *a lungo termine*, di natura cronica, effetto senza presenza di soglia;

È evidente l'importanza di questa classificazione, in quanto, nel caso ci sia un effetto che si manifesta soltanto se si superano certi valori dell'entità fisica che li determina (valore di soglia), la protezione dallo stesso effetto è molto semplice, dal momento che basta limitare l'esposizione all'agente nocivo ad un valore inferiore a quello di soglia perché l'effetto stesso non si verifichi. Un effetto immediato è generalmente identificato in modo diretto, perché la relazione di causa ed effetto può essere stabilita facilmente. Inoltre,

le relazioni quantitative sono facilmente determinate e convalidate. Se un effetto negativo segue l'esposizione con notevole ritardo, la sua identificazione richiede un giudizio scientifico più difficile, specialmente in assenza di un meccanismo biofisico di interazione noto. Anche nel caso in cui un effetto negativo (ritardato) sia stato identificato, le relazioni quantitative tra esposizione ed effetto possono essere difficili da accertare, perchè può essere difficoltoso determinare il quadro espositivo e possono essere ignote le metriche espositive da applicare. Un effetto biologico può essere quantificato in diversi modi e si possono quindi stabilire diverse relazioni con l'esposizione. Per esempio, si può misurare secondo la grandezza biologicamente efficace il grado di un certo effetto in una persona, la percentuale di persone che presentano l'effetto, oppure i rischi relativi che emergono dal confronto tra gruppi a diverso livello di esposizione. Il modo in cui queste misure contribuiscono alla valutazione del rischio è molto diverso. Secondo la qualità della stima dell'esposizione, queste misure possono anche avere una certa utilità per stabilire relazioni numeriche tra esposizioni e rischio.

Nel caso in cui per una data popolazione si sia in grado di determinare la distribuzione dell'esposizione e di quantificare la relazione tra esposizione e rischio, è possibile, in linea di principio, stimare il numero di individui che manifestano quell'effetto. Questo tipo di stima (o altre equivalenti come, ad esempio, quella del rischio individuale sull'arco della intera vita) costituisce lo scopo ultimo di una valutazione del **rischio sanitario** (ICNIRP Review).

Il rischio sanitario, così come quello ambientale, rappresenta la probabilità che si verifichino eventi che producano danni alla salute umana o all'ambiente. Quello del rischio è un concetto connesso con le aspettative umane e le capacità umane di predizione e di intervento in situazioni non note o incerte.

La caratterizzazione finale del rischio sanitario ha come presupposti principali:

- a) l'avvenuta definizione del livello di contaminazione delle matrici ambientali destinate a venire a contatto con le persone;
- b) la conoscenza delle relazioni dose-risposta;
- c) la disponibilità di informazioni adeguate relative all'utilizzo del territorio nei punti di presenza della contaminazione ambientale;

2.2 ESPOSIZIONE E DOSIMETRIA

La dosimetria quantifica l'interazione tra un campo elettromagnetico e un sistema biologico ad esso esposto. Il problema della dosimetria dei campi elettromagnetici consiste nella:

- a) quantificazione della potenza assorbita da un organismo biologico immerso in un campo elettromagnetico;
- b) determinazione della distribuzione di tale potenza nell'organismo esposto;
(Andreuccetti et al 2001 CNR Firenze)

Un agente fisico quindi deve interagire con un tessuto bersaglio per poter indurre un effetto biologico. L'agente esterno al corpo e le risposte biologiche sono direttamente misurabili, ma l'interazione decisiva che ha luogo in corrispondenza del bersaglio generalmente non lo è. Sono la natura di questa interazione (ad esempio reazioni fotochimiche o induzione di una corrente elettrica) e la sua efficacia a determinare l'effetto biologico. Pertanto, la quantità significativa dal punto di vista biologico, che rappresenta l'efficacia con cui un certo effetto viene indotto, deve essere collegata quantitativamente alla radiazione esterna associata (o ai campi elettrico e magnetico). Ne consegue che tipi diversi di effetti possono essere collegati a grandezze biologicamente efficaci diverse.

Una buona comprensione dell'interazione fondamentale, e un'accurata definizione della grandezza biologicamente efficace sono requisiti necessari quando si vogliono utilizzare i risultati di esperimenti su animali o in vitro per valutare possibili risposte nell'uomo. (ICNIRP Review).

La *grandezza biologicamente efficace* riflette l'efficienza con cui un'esposizione esterna produce un certo effetto biologico. Questa relazione quantitativa tra l'esposizione esterna misurabile ed il parametro biologicamente efficace per il tessuto bersaglio è specifica di ogni condizione di esposizione. Quindi dato un livello di esposizione esterna, qualunque cambiamento delle condizioni di esposizione può influenzare l'efficacia dell'interazione mediante la quale viene indotto un certo effetto biologico.

Dal punto di vista degli effetti biologici dei campi elettromagnetici sull'uomo è pratica diffusa ormai distinguere gli effetti dei campi in due categorie: quelli indotti dai campi a *bassa frequenza* (in genere associati ad elettrodotti, centrali elettriche, cabine primarie e secondarie, stazioni elettriche) e quelli indotti da *campi a radiofrequenza (RF) e microonde (MW)* (telefonia mobile, stazioni radio base, emittenti radio-televisive).

In questo lavoro di tesi come vedremo più avanti l'attenzione verrà focalizzata sui campi elettromagnetici ad alta frequenza prodotti dagli apparati di telefonia mobile

(frequenza di utilizzo 1800 MHz). In questo campo di studi la grandezza biologicamente efficace è il *tasso specifico di assorbimento o SAR (Specific Absorption Rate)*.

2.2.1 Campi Elettromagnetici ad alta frequenza

Dato l'immenso numero di utenti di telefonia mobile, eventuali effetti sanitari, anche minimi, potrebbero avere importanti implicazioni per la salute pubblica. Al momento di valutare i possibili effetti nocivi dell'esposizione umana ai campi a radiofrequenza, si devono prendere in considerazione diversi elementi importanti: uno di questi è la frequenza di funzionamento. Gli attuali sistemi di telefonia mobile operano a frequenze comprese tra gli 800 e i 1800 MHz. È fondamentale non confondere i campi a radiofrequenza con le radiazioni ionizzanti, quali raggi X e raggi gamma. A differenza delle radiazioni ionizzanti, i campi a radiofrequenza non possono causare ionizzazione o radioattività nel corpo, in quanto sono troppo deboli per rompere i legami che tengono unite le molecole nelle cellule. Per questa ragione, sono indicati come **radiazioni non ionizzanti (NIR)**. I telefoni cellulari e le stazioni radio base presentano situazioni di esposizione molto diverse. L'esposizione ai campi a radiofrequenza di chi utilizza un telefonino è molto superiore a quella di chi vive vicino ad una stazione radio base. Comunque, a parte gli sporadici segnali emessi per mantenere il contatto con le stazioni radiobase vicine, i dispositivi cellulari trasmettono energia a radiofrequenza solo durante le chiamate, mentre le stazioni radio-base trasmettono continuamente segnali. I telefonini sono trasmettitori a radiofrequenza di bassa potenza, che emettono potenze massime contenute tra 0,2 e 0,6 Watt. L'intensità di un campo a radiofrequenza (e quindi l'esposizione di un generico utente) decresce rapidamente con l'aumentare della distanza dal telefonino. Di conseguenza, l'esposizione di un utente con il cellulare posto ad alcune decine di centimetri dalla testa (con l'ausilio di dispositivi che lascino libere le mani, tipo auricolari o viva-voce) è di gran lunga inferiore a quella di un utente che tenga il dispositivo appoggiato alla testa. Le stazioni radio-base trasmettono a livelli di potenza che vanno da pochi Watt sino a 100 Watt e oltre, a seconda dell'ampiezza della regione, o "cella" che devono coprire con il segnale radio; le antenne sono generalmente larghe 20-30 cm per un metro di lunghezza e sono montate su edifici o tralicci ad un'altezza dal suolo che varia dai 15 ai 50 metri. Queste antenne emettono fasci di energia a radiofrequenza che sono tipicamente molto stretti nella direzione verticale, ma abbastanza larghi nella direzione orizzontale. L'intensità del campo a radiofrequenza cresce leggermente quando

ci si allontana dalla stazione radio base e torna a decrescere a distanze maggiori dall'antenna. Dal momento che le antenne dirigono la loro potenza verso l'esterno, e non irradiano quantità significative di energia né all'indietro né verso l'alto e il basso, i livelli di energia all'interno o ai lati degli edifici sono normalmente molto bassi.



Figura 2.1 Stazioni radio-base e dispositivi per telefonia mobile.

I campi RF tra 1 MHz e 10 GHz penetrano nei tessuti esposti e producono calore a seguito dell'assorbimento di energia in questi tessuti. L'assorbimento di energia a campi RF da parte dei tessuti è misurato come *tasso di assorbimento specifico* entro una data massa di tessuto e viene comunemente chiamato **SAR** (*Specific Absorption Rate*). Il SAR è la grandezza dosimetrica fondamentale per i campi RF. Descrive lo scambio energetico che avviene tra radiazione elettromagnetica e materia vivente, ovvero la quantità di energia ceduta dalla radiazione per unità di massa:

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

- σ è la conducibilità elettrica del tessuto [S/m],
- E_{int} è il campo elettrico indotto internamente [V/m],
- ρ è la densità del tessuto [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 lontano).
- caratteristiche del corpo 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 (ICNIRP Review).

L'unità di misura del SAR è il *Watt per chilogrammo (W/Kg)*. Esso 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 sempre nel caso di studi su cellule).

A questo proposito descriviamo brevemente alcune delle caratteristiche elettriche dei tessuti biologici. Essi si comportano a seconda della frequenza a cui sono esposti e del tipo di tessuto, come dielettrici o come conduttori più o meno buoni, e il loro comportamento può essere descritto da due grandezze fondamentali:

- *conducibilità elettrica* σ [S/m]
- *costante dielettrica assoluta* ε [F/m]

Ricordiamo che la conducibilità elettrica σ rappresenta una grandezza che definisce la capacità delle cariche elettriche di muoversi all'interno di un mezzo, nel nostro caso un tessuto biologico. L'altro parametro importante è ε ossia la costante dielettrica assoluta di un mezzo che riempie lo spazio. Quando il mezzo nel quale hanno sede i campi elettrici e magnetici è il vuoto, essa coincide con la quantità ε_0 che è la costante dielettrica assoluta del vuoto. Tuttavia non sempre ε e ε_0 sono uguali, infatti il rapporto tra le due quantità dà origine ad un'altra grandezza detta ε_r , e cioè la *costante dielettrica relativa al materiale*. Essa in genere è sempre maggiore dell'unità e varia al variare del materiale. Tra i materiali di interesse biologico ricordiamo in particolare l'acqua, la cui costante dielettrica relativa assume un valore molto elevato ($\varepsilon_r = 80$) (Andreuccetti et al 2001 CNR Firenze).

Può essere tuttavia utile ricordare che nella letteratura tecnica viene spesso utilizzata al posto della conducibilità σ , una quantità ad essa proporzionale detta *tangente di perdita*, così definita:

$$\tan \alpha = \frac{\sigma}{2\pi \cdot \varepsilon \cdot \nu}$$

La tangente di perdita valuta se un tessuto è un buon conduttore, e per definizione esso lo è tanto più quanto più elevato risulta il valore di $\tan\alpha$.

Come già accennato, nel caso dei tessuti biologici l'elemento di maggior significato per le sue proprietà elettriche è l'*acqua*, la quale, come è noto costituisce circa il 70 per cento del peso del corpo umano. L'acqua circonda e permea le cellule. In essa sono disciolti ioni salini e grosse molecole organiche. E' quindi logico che le caratteristiche elettriche dei vari tessuti biologici siano strettamente correlate con la percentuale di acqua in essi contenuta. Alle frequenze più basse, però, le proprietà dielettriche dei tessuti dipendono fortemente anche dalle loro proprietà strutturali (architetture cellulari, presenza di membrane, risposta al campo elettrico delle grosse biomolecole, ecc.). In conseguenza di ciò, queste proprietà risultano notevolmente complicate. Pur con andamenti simili, ϵ_r e σ variano abbastanza da tessuto a tessuto. Per valori superiori al centinaio di MHz, il comportamento risulta relativamente più semplice, essendo questo determinato in massima parte dalle proprietà di dispersione della molecola di H_2O e dalla conducibilità dovuta agli elettroliti in essa disciolti. (Andreuccetti et al 2001 CNR Firenze).

2.2.2 Campi Elettromagnetici a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF)

Con il termine linea elettrica si definisce un sistema elettrico avente lo scopo di collegare tra loro due sezioni di una rete elettrica, trasferendo potenza dal punto di origine al punto di arrivo. Le linee per il trasporto dell'energia elettrica, o *elettrodotti*, generano nelle aree che li circondano campi elettrici e magnetici alla frequenza di rete di 50 o 60 Hz. I campi elettromagnetici così generati rientrano in quell'intervallo di spettro elettromagnetico definito "a frequenza estremamente basse" o campi **ELF** (dall'inglese *Extremely Low Frequency*).



Figura 2.2 Linee elettriche per il trasporto di elettricità.

L'intensità dei campi elettromagnetici prodotti dalle linee elettriche diminuisce rapidamente con la distanza. Già a qualche decina di metri da una linea ad alta tensione l'intensità del campo magnetico scende a livelli confrontabili con quelli che possono trovarsi nelle case e nei normali ambienti di vita, a causa della presenza di altre sorgenti di campi elettrici e magnetici, quali impianti elettrici e dispositivi alimentati dalla rete elettrica. Anche le stazioni e le cabine di trasformazione sono sorgenti di campi elettrici e magnetici alla frequenza di rete, ma le loro intensità sono inferiori e diminuiscono ancora più rapidamente: in pratica, si distinguono dai livelli di fondo ambientale solo nelle immediate vicinanze delle apparecchiature.

I campi elettrici e magnetici a 50 o 60 Hz di origine naturale sono estremamente bassi, rispettivamente dell'ordine di 0,0001 V/m e 0,00001 μ T. L'esposizione di esseri umani a campi ELF è soprattutto associata alla produzione, alla trasmissione e all'uso dell'energia elettrica. L'energia elettrica prodotta dagli impianti di produzione è distribuita agli utenti attraverso linee di trasmissione ad alta tensione. Per abbassare la tensione al momento della connessione con le linee di distribuzione che forniscono l'energia alle abitazioni, vengono utilizzati dei trasformatori, che fanno sì che la tensione che preleviamo alla presa di corrente della rete domestica abbia un valore di 220 V e una frequenza di 50 Hz. I campi elettrici e magnetici immediatamente al di sotto delle linee aeree di trasmissione possono raggiungere rispettivamente 12 kV/m e 30 μ T. Attorno agli impianti di produzione e alle sottostazioni si possono trovare campi elettrici fino a 16 kV/m e campi magnetici fino a 270 μ T. Negli ambienti domestici i campi elettrici e magnetici dipendono da molti fattori, tra cui la distanza da elettrodotti locali, il numero ed il tipo di elettrodomestici usati. I campi elettrici attorno agli elettrodomestici e alla maggior parte degli altri dispositivi non superano tipicamente i 500 V/m, mentre i campi magnetici non superano i 150 μ T. In entrambi i casi, l'intensità dei campi può essere sensibilmente maggiore a brevi distanze, ma diminuisce rapidamente allontanandosi dalla sorgente. Gli ambienti di lavoro presentano invece condizioni di esposizione più intense; i lavoratori addetti alla manutenzione delle linee di trasmissione e di distribuzione possono essere esposti a campi elettrici e magnetici molto intensi. All'interno degli impianti di produzione e delle sottostazioni si possono trovare campi elettrici superiori a 25 kV/m e campi magnetici superiori a 2 mT.

Ogni volta che l'elettricità viene trasportata attraverso linee di trasmissione ad alta tensione o linee di distribuzione locale, oppure è utilizzata da qualche dispositivo, si creano attorno alle linee o alle apparecchiature dei campi elettrici e magnetici. I campi elettrici e

magnetici ELF inducono all'interno del corpo campi elettrici e correnti elettriche che possono stimolare tessuti elettricamente eccitabili, in particolare quelli del sistema nervoso e i tessuti muscolari.

Nel caso di campi elettromagnetici ELF la grandezza dosimetrica di riferimento direttamente correlabile agli effetti biologici osservabili è la *densità di corrente* (J) espressa in *Ampère su metro quadro* [A/m^2].

2.3 STUDI SULL'ESPOSIZIONE A CAMPI ELETTROMAGNETICI

La ricerca di vari decenni, con la pubblicazione di migliaia di articoli scientifici, ha permesso di identificare chiaramente alcuni effetti sanitari. I dati indicano che la maggior parte degli effetti accertati sono acuti, cioè si presentano come risposta immediata all'esposizione, e si osservano solo al di sopra di determinate soglie, ovviamente più alte delle soglie per gli effetti biologici. Questi si contrappongono ad altri effetti che possono manifestarsi solo dopo un'esposizione di lungo periodo e/o dopo una lunga latenza. È stata infatti 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). La possibilità di effetti a lungo termine dell'esposizione a campi ELF o a campi a radiofrequenza e microonde è stata oggetto di un crescente numero di studi negli ultimi anni. Un requisito fondamentale di qualunque studio che indaghi un potenziale effetto sulla salute è un'affidabile valutazione dell'esposizione. La mancanza di conoscenze sui meccanismi di base costituisce spesso un problema centrale ai fini dell'affidabilità.

I campi elettromagnetici a radiofrequenza e microonde trasportano energia elettromagnetica che viene assorbita dai tessuti corporei e trasformata in calore, provocando in definitiva un aumento di temperatura dell'intero corpo o di sue parti, secondo la 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 indicati come *effetti termici*.

Tuttavia l'interazione tra un sistema biologico e un campo elettromagnetico può dar luogo anche ad altri effetti che possono avere rilevanza biologica, e che solitamente sono meglio conosciuti come *effetti non termici*. In questo caso si parla principalmente di:

- **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 a tutt'oggi risultati certi e definitivi. Azioni sono possibili anche su molte **macromolecole**, quali *acidi nucleici, proteine, ed enzimi* 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.

- **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, ruolo nella conduzione dell'impulso nervoso e trasporto di molecole dal comparto extra a quello intracellulare e viceversa). 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 differenza di potenziale 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. Il meccanismo di azione e le eventuali implicazioni biomediche non sono chiare. (Andreuccetti et al 2001 CNR Firenze)

2.3.1 Studi sulle esposizioni a campi elettromagnetici a radiofrequenze (RF)

a) Studi in vitro

Studi su cellule in coltura: permettono di esaminare i possibili meccanismi di interazione dei campi a radiofrequenza con organi e tessuti, in un ambiente controllato. La maggior parte degli studi sul ruolo dei campi a radiofrequenza come *potenziale agente cancerogeno* non mostrano effetti genotossici a livelli non termici. I risultati di prove su micronuclei, che sono una misura del danno ai cromosomi, sono contraddittori (NRPB Review). L'evidenza scientifica attuale indica che l'esposizione a campi a radiofrequenza quali quelli emessi dai telefoni cellulari e dalle stazioni radio base non inducono o favoriscono, verosimilmente, il *cancro*. Altri studi hanno suggerito che i campi RF modifichino il tasso

di proliferazione delle cellule (Czerska et al 1992, Clearly et al 1996), alterino l'attività enzimatica, o agiscano sui geni del DNA delle cellule causando la rottura dei filamenti di DNA (Juutilainen J. 1998, Brusick D. 1998, Verschaeve et al 1998, Maes et al 1993, Vijayalaxmi et al 1997, Kerbacher et al 1990). Tuttavia questi effetti non sono ben accertati e le loro implicazioni per la salute umana non sono comprese abbastanza bene da poter fornire una base per la limitazione dell'esposizione.

Studi sull'espressione di proteine di shock termico (HSP): considerate come un indicatore di stress preposte alla difesa dell'organismo a seguito di aumenti di temperatura o condizioni tossiche, sono interessanti in quanto gli esperimenti sembrano mostrare effetti positivi, anche a bassi valori del tasso di assorbimento specifico (Franzellitti et al. 2008, Cotgreave, 2004). Vi sono alcuni dati indicanti che esposizioni a CEM stimolano le cellule a produrre queste proteine e che una pre-esposizione a CEM potrebbe indurre una protezione delle cellule contro agenti di stress come per esempio il calore, il perossido di idrogeno ecc. Altre variazioni biologiche nelle cellule per effetto dell'esposizione a campi a radiofrequenza, quando sono state trovate, sono risultate piccole, tendenzialmente solo un po' maggiori dell'incertezza legata alla precisione della tecnica di misura utilizzata. Le implicazioni per la salute umana di una qualsiasi variazione biologica di questo tipo possono solo essere oggetto di congetture (NRPB Review).

Studi sui flussi di ioni calcio nelle cellule: questi sono valutati come misura della funzionalità cellulare. Studi di questo tipo sono stati esaminati recentemente dall'IEGMP (*Independent Expert Group on Mobile Phones*), con la conclusione che le evidenze che bassi livelli di campi a radiofrequenza modulati in ampiezza possano causare il rilascio di calcio dai tessuti siano perlopiù contraddittorie (Dutta et al 1984, Meyer et al 1998). Questo aspetto è stato successivamente esaminato in modo più approfondito dal Gruppo Consultivo in rapporto all'uso di sistemi di comunicazione TETRA. La conclusione è stata che si dovrebbero effettuare ulteriori ricerche, anche se in generale gli studi meglio progettati dei precedenti non hanno rilevato un aumento nei flussi del calcio nei tessuti per effetto dell'esposizione a campi a radiofrequenza in varie condizioni e con diverse modulazioni. Attualmente ci sono poche ricerche sul flusso di ioni calcio nelle cellule per trarre conclusioni solide. Sono stati però analizzati due recenti studi ben progettati ed entrambi non mostrano alcun cambiamento nella concentrazione cellulare di ioni calcio (un indicatore sensibile di patologie della cellula) in risposta all'esposizione a campi a radiofrequenza; ciò aumenta ulteriormente i dubbi sull'esistenza di un effetto specifico della modulazione a impulsi sul flusso del calcio (NRPB Review).

b) Studi in vivo

Gli studi recenti su animali, relativi agli effetti dell'esposizione a campi a radiofrequenza, hanno utilizzato principalmente i campi caratteristici dei sistemi di telefonia mobile. L'esposizione di animali da laboratorio a campi elettromagnetici che provocano un assorbimento superiore a circa 4 W/Kg ha rivelato un quadro caratteristico di risposte del sistema di termoregolazione, in cui la temperatura corporea inizialmente aumenta per poi stabilizzarsi in seguito all'attivazione dei meccanismi di termoregolazione (Michaelson et al 1983). Diversi studi su roditori hanno anche dimostrato una componente comportamentale delle risposte legate alla termoregolazione. Sono state osservate in ratti e scimmie riduzioni nella capacità di svolgere alcuni compiti in corrispondenza di valori di SAR compresi tra 1 e 3 W/Kg (Stern et al. 1979; Adair e Adams 1980; de Lorge e Ezell 1980; D'Andrea et al 1986). Per quanto riguarda la possibile cancerogenicità, diversi studi che usavano modelli animali ben consolidati non hanno trovato alcuna evidenza di effetti genotossici, mutageni o cancerogeni. In particolare i risultati di un ampio studio non ne hanno confermato i risultati secondo cui l'esposizione a radiofrequenza causava un aumento dell'incidenza di linfoma in una linea di topi transgenici, predisposti all'induzione di linfomi. Inoltre, in un numero di prove a lungo o a medio termine su roditori, l'esposizione a campi a radiofrequenza non influiva sulla sopravvivenza e sull'incidenza di tumori spontanei, né sull'incidenza di linfomi indotti da raggi X, di tumori cerebrali spontanei o indotti chimicamente, o di tumori al seno o della pelle indotti chimicamente. Non c'è alcuna evidenza sperimentale diretta che suggerisca che l'esposizione a campi a radiofrequenza aumenti il rischio di cancro (NRPB Review).

La fertilità maschile è da tempo riconosciuta come suscettibile al calore, e gli studi su animali hanno confermato una simile suscettibilità per esposizioni a campi a radiofrequenza a livelli termicamente significativi; studi recenti supportano il giudizio che tali effetti non si verificano ai livelli di esposizione più bassi.

La maggior parte degli studi su animali non ha riportato alcuna risposta dipendente dai 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: i risultati di un recente studio svedese di alto profilo, non hanno fornito evidenze di un effetto sulla barriera emato-encefalica in dipendenza del campo. E' possibile che l'esposizione a campi a radiofrequenza possa indurre cambiamenti *nell'attività colinergica nel cervello*, ma questi cambiamenti possono essere il riflesso di risposte di termoregolazione. Tuttavia le indicazioni meno controverse sugli effetti di

campi a radiofrequenza di bassa intensità su funzioni neurocomportamentali si riferiscono proprio a variazioni nell'attività colinergica e oppioide. Cambiamenti delle funzioni colinergiche indotti dai campi elettromagnetici potrebbero far presagire effetti sull'apprendimento e sulla memoria, ma le evidenze di tali effetti non sono chiare: due studi effettuati da un laboratorio con l'utilizzo di microonde pulsate hanno riportato deficit comportamentali in dipendenza del campo, ma gli stessi effetti non sono stati confermati in due studi indipendenti che utilizzavano segnali GSM. Inoltre, effetti significativi sulle prestazioni di un'azione correlata si sono osservati solo quando l'esposizione dava luogo a sensibili aumenti della temperatura corporea (NRPB Rewies).

In breve sintesi, vi sono molti lavori che suggeriscono che i campi a microonde non siano mutageni e che quindi l'esposizione a questi campi non possa, verosimilmente, iniziare la cancerogenesi (NRPB 1992; Cridland 1993; UNEP/WHO/IRPA 1993). Per contro, alcuni recenti studi suggeriscono che l'esposizione di roditori a campi a microonde, a livelli di SAR dell'ordine di 1 W/kg, possano produrre rotture nel filamento del DNA di tessuti testicolari e cerebrali (Sarkar et al. 1994; Lai e Singh 1995, 1996) (ICNIRP Review)

c) Studi epidemiologici

Le indagini sulle associazioni tra livelli di esposizione ed effetti negativi per la salute fanno spesso uso di *studi epidemiologici*. L'epidemiologia studia la distribuzione ed i determinanti dello stato di salute nelle popolazioni. L'epidemiologia analitica ha lo scopo di identificare e/o descrivere relazioni tra esposizioni ad agenti fisici, chimici e biologici ed effetti sulla salute. Questa metodologia di studio viene utilizzata soprattutto per valutare gli effetti a lungo termine di un certo tipo di esposizione. Nonostante la loro rilevanza diretta, i risultati degli studi epidemiologici non possono però fornire la prova sufficiente di una relazione causale in assenza di una plausibilità biologica o del sostegno di dati forniti da studi sperimentali; ciò è particolarmente vero quando i rischi suggeriti dagli studi sono piccoli (come nel caso dei campi elettromagnetici). (ICNIRP Review)

Dati sulle risposte dell'organismo umano a campi elettromagnetici ad alta frequenza che producano un riscaldamento rilevabile sono stati ottenuti da esperimenti controllati su volontari e da studi epidemiologici su lavoratori esposti a particolari sorgenti, come radar, apparati per diatermia in campo medico e termosaldatrici. Questi dati hanno confermato pienamente la conclusione degli studi di laboratorio, secondo cui effetti biologici negativi possono essere causati da aumenti della temperatura dei tessuti superiori

a 1 °C. Gli studi epidemiologici su lavoratori esposti e sulla popolazione non hanno mostrato alcun effetto sanitario di rilievo associato ai tipici livelli ambientali di esposizione. Gli studi sul rischio di cancro ed esposizione a microonde sono pochi e generalmente carenti per quanto riguarda la valutazione delle esposizioni. Due indagini epidemiologiche su lavoratori addetti a radar, nell'industria aeronautica e nelle forze armate degli Stati Uniti, non hanno trovato alcuna evidenza di aumenti di patologie o di mortalità, per nessuna causa (Barron e Baraff 1958; Robinette et al. 1980; UNEP/WHO/IRPA 1993). Risultati analoghi sono stati ottenuti da Lilienfeld et al. (1978) in uno studio su dipendenti dell'ambasciata degli Stati Uniti a Mosca, che erano stati cronicamente esposti a radiazione a microonde di bassa intensità. Selvin et al. (1992) non hanno segnalato alcun aumento del rischio di cancro in bambini cronicamente esposti alle radiazioni prodotte da un grande trasmettitore di microonde vicino alle loro abitazioni. Studi più recenti non sono giunti a dimostrare alcun aumento significativo di tumori del sistema nervoso in lavoratori e personale militare esposti a campi a microonde (Beall et al. 1996; Grayson 1996). Inoltre, non è risultato alcun aumento della mortalità totale tra utenti di telefoni mobili (Rothman et al. 1996 a, b), ma è ancora troppo presto per osservare un effetto sull'incidenza di tumori o sulla relativa mortalità.

Uno studio ha segnalato un aumento del rischio di cancro in personale militare (Szmigielski et al. 1988), ma i risultati sono difficili da interpretare perché non vengono chiaramente specificati né la dimensione della popolazione in studio, né i livelli di esposizione. In uno studio successivo Szmigielski (1996) ha trovato aumenti nella frequenza di leucemie e di linfomi tra militari esposti a campi elettromagnetici, ma la valutazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici non era ben definita. Alcuni recenti studi su popolazioni che vivevano vicino a trasmettitori di campi elettromagnetici hanno suggerito un aumento locale dell'incidenza di leucemie (Hocking et al. 1996; Dolk et al. 1997a, b), ma i loro risultati sono non conclusivi. Nel complesso, i risultati dei pochi studi epidemiologici forniscono solo informazioni limitate sul rischio di cancro.

Di notevole interesse sono i possibili effetti cancerogeni dell'esposizione a campi a microonde, nell'intervallo di frequenze utilizzato dai più diffusi sistemi di comunicazione, compresi i telefoni mobili e le relative stazioni radio base. Anche se in alcuni studi vi sono stati risultati positivi per specifici tumori, in relazione all'uso di telefoni mobili oppure all'esposizione (o alla possibilità di esposizione) a campi a radiofrequenza in ambito professionale o residenziale, nessuna relazione è stata dimostrata in modo coerente. Inoltre, non c'è dimostrazione convincente di una relazione dose-risposta o durata-risposta. Nel

complesso, nessun tipo di dati epidemiologici fornisce un'evidenza persuasiva che l'esposizione ai campi a radiofrequenza causi il cancro. Questa conclusione si considera compatibile con il complesso delle evidenze biologiche, che suggeriscono che esposizioni a campi a radiofrequenza al di sotto dei limiti delle linee guida non causino mutazioni e non inneschino o favoriscano la formazione di tumori.

Tuttavia, i telefoni mobili non sono in uso da un tempo sufficientemente lungo da consentire una valutazione epidemiologica completa del loro impatto sulla salute per cui non si può escludere la possibilità di qualche associazione tra tecnologie di telefonia mobile e cancro.

Vi sono ancora carenze nella ricerca epidemiologica, come ad esempio un'insoddisfacente valutazione delle esposizioni; comunque, gli studi non hanno fornito evidenze convincenti che i tipici livelli di esposizione portino ad effetti nocivi nella riproduzione o ad aumenti del rischio di cancro negli individui esposti. Questo è in accordo con i risultati della ricerca di laboratorio su modelli cellulari e animali, che non hanno dimostrato effetti teratogeni o cancerogeni dell'esposizione a livelli non termici di campi elettromagnetici ad alta frequenza.

In generale gli effetti dell'esposizione dei sistemi biologici a livelli non termici di campi elettromagnetici modulati in ampiezza sono piccoli e molto difficilmente possono essere collegati a potenziali effetti sulla salute.

Quindi, sebbene gli studi non suggeriscano un aumento del rischio di cancro, neppure lo eludono, specialmente in relazione ad alte esposizioni cumulative a telefoni cellulari ed a possibili effetti che si manifestino molti anni dopo il loro utilizzo.

2.3.2 Studi sulle esposizioni a campi a frequenza estremamente bassa (ELF-EMF)

E' noto che i campi ELF interagiscono con i sistemi biologici. Il solo modo in cui i campi ELF interagiscono con cellule, organi e tessuti è mediante l'induzione di campi elettrici e correnti. L'intensità delle correnti indotte per effetto dell'esposizione a campi ELF di livelli pari a quelli che normalmente si riscontrano nel nostro ambiente è comunque minore di quella delle correnti prodotte naturalmente all'interno del corpo.

a) Studi su sistemi in vitro ed in vivo

Nonostante siano stati effettuati numerosi studi per rivelare effetti biologici di campi elettrici e magnetici ELF, solo poche ricerche sistematiche hanno individuato delle soglie caratteristiche, in termini di intensità dei campi, oltre le quali si producessero significative perturbazioni delle funzioni biologiche. La letteratura riporta numerose segnalazioni di effetti *in vitro* dei campi ELF sulle proprietà delle membrane cellulari (trasporto ionico ed interazione dei mitogeni con i recettori alla superficie della cellula) e variazioni nelle funzioni cellulari e nelle proprietà di crescita (ad esempio aumento della proliferazione e alterazioni nel metabolismo, espressione genica, biosintesi delle proteine ed attività enzimatica) (Cridland 1993; Sienkiewicz et al. 1993; Tenforde 1991, 1992, 1993, 1996). Una notevole attenzione si è concentrata sugli effetti dei campi a bassa frequenza sul trasporto dello ione Ca^{2+} attraverso le membrane cellulari e sulla concentrazione intracellulare di questo ione (Walleczek e Liburdy 1990; Liburdy 1992; Walleczek 1992), sulla sintesi di RNA messaggero e di proteine (Goodman et al. 1983; Goodman e Henderson 1988, 1991; Greene et al. 1991; Phillips et al. 1992), e sull'attività di enzimi come l'ornitina decarbossilasi (ODC) che sono legati alla proliferazione cellulare e alla promozione di tumori (Byus et al. 1987, 1988, Livovitz et al. 1991, 1993). Tuttavia, prima che queste osservazioni possano essere utilizzate per definire dei limiti di esposizione, è essenziale accertare sia la loro riproducibilità, sia la loro rilevanza per il cancro e per altri effetti negativi sulla salute. L'importanza di questo punto è evidenziata dal fatto che vi sono state difficoltà nella replicazione di alcune osservazioni fondamentali di effetti dei campi sull'espressione genica e sulla sintesi proteica (Lacy-Hulbert et al. 1995; Saffer e Thurston 1995).

Non esiste alcuna evidenza che i campi ELF alterino la struttura del DNA e della cromatina, e non è previsto alcun conseguente effetto di mutazione o di trasformazione neoplastica. Ciò è confortato dai risultati di studi di laboratorio che erano stati progettati per rivelare danni al DNA e ai cromosomi, casi di mutazione e aumenti nella frequenza di trasformazioni come conseguenza di esposizioni a campi ELF (NRPB 1992; Murphy et al. 1993; McCann et al. 1993; Tenforde 1996). La mancanza di effetti sulla struttura cromosomica suggerisce che i campi ELF, nel caso in cui abbiano qualche effetto sul processo di cancerogenesi, agiscano più verosimilmente come *promotori* che come iniziatori, aumentando la proliferazione di cellule geneticamente alterate piuttosto che provocare la lesione iniziale nel DNA o nella cromatina. Gli studi recenti si sono quindi focalizzati su una ricerca di effetti dei campi ELF nelle fasi di promozione e di

progressione dello sviluppo tumorale, dopo che il processo è stato iniziato da un cancerogeno chimico.

Gli studi sulla crescita in vivo di cellule tumorali e sullo sviluppo di tumori trapiantati in roditori non hanno fornito solide evidenze di possibili effetti cancerogeni dell'esposizione a campi ELF (Tenforde 1996). Diversi studi di più diretta rilevanza per il cancro nell'uomo hanno fatto uso di prove in vivo dell'attività di promozione su tumori della pelle, del fegato, del cervello e della mammella in roditori da parte dei campi. Tre studi sulla promozione di tumori cutanei (McLean et al. 1991; Rannug et al. 1993a, 1994) non sono riusciti a dimostrare alcun effetto dell'esposizione continua o intermittente a campi elettromagnetici a frequenza industriale nella promozione di tumori indotti chimicamente.

Alcuni ricercatori hanno segnalato che l'esposizione a campi ELF può sopprimere la secrezione di *melatonina*, un ormone collegato ai nostri ritmi giorno-notte. E' stato suggerito che la melatonina possa essere un fattore protettivo contro il tumore mammario, cosicché questa soppressione potrebbe contribuire ad un aumento dell'incidenza di tumori mammari già iniziati da altri agenti. Mentre esiste qualche evidenza di effetti sulla melatonina in animali da laboratorio, gli studi su volontari non hanno confermato queste variazioni nell'uomo.

b) Studi epidemiologici

Nel 1979, Wertheimer e Leeper segnalavano un'associazione tra la leucemia infantile e certe caratteristiche dei circuiti che collegavano le case dei soggetti alle linee di distribuzione dell'elettricità. Da allora, è stato condotto un gran numero di studi per verificare questo importante risultato. Un'analisi di questi lavori da parte dell'Accademia Nazionale delle Scienze degli Stati Uniti nel 1996 ha suggerito che la residenza vicino a elettrodotti fosse associata ad un aumento del rischio di leucemia infantile (rischio relativo RR=1,5), ma non di altre forme di cancro. Da questi studi non emergeva un'analoga associazione tra il cancro e l'esposizione residenziale degli adulti. Molti studi su soggetti esposti per motivi professionali a campi ELF, condotti nell'ultimo decennio, presentano molte contraddizioni. Essi suggeriscono che possa esserci un piccolo aumento del rischio di leucemia tra i lavoratori che operano nel settore elettrico. Tuttavia, in molti di questi studi non sono stati tenuti in appropriata considerazione i fattori di confondimento, come ad esempio l'esposizione agli agenti chimici presenti negli ambienti di lavoro. Le valutazioni dell'esposizione a campi ELF non presentavano una buona correlazione con il rischio di cancro nei soggetti esposti. Quindi, non risultava confermata una relazione di causa ed effetto tra l'esposizione a campi ELF e il cancro. Nel giugno 1998, il NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences) ha convocato un gruppo di lavoro internazionale per una revisione critica dei risultati delle ultime ricerche. Il gruppo di lavoro, usando i criteri stabiliti dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (International Agency for Research on Cancer, IARC), ha concluso che i campi ELF debbano essere considerati come un *“possibile cancerogeno per l'uomo”*. *“Possibile cancerogeno per l'uomo”* è la più bassa di tre categorie (*“possibilmente cancerogeno per l'uomo”*, *“probabilmente cancerogeno per l'uomo”* e *“cancerogeno per l'uomo”*) usate dalla IARC per classificare l'evidenza scientifica relativa ad agenti potenzialmente cancerogeni. *“Possibile cancerogeno per l'uomo”* è una classificazione usata per denotare un agente per il quale vi sia una limitata evidenza di cancerogenicità nell'uomo ed un'evidenza meno che sufficiente negli animali da esperimento. Quindi la classificazione è basata sulla solidità dell'evidenza scientifica, non su quanto l'agente sia cancerogeno, ovvero su quanto elevato sia il rischio di cancro ad esso associato. Significa che esiste una limitata evidenza credibile che suggerisce che l'esposizione a campi ELF possa provocare il cancro, tuttavia i risultati ottenuti in questo campo di studio sono spesso contraddittori e non ancora definitivi, per cui sono necessarie ulteriori ricerche per risolvere il problema.

3. NORMATIVE E LINEE GUIDA PER L'ESPOSIZIONE A CAMPI ELETTROMAGNETICI NON IONIZZANTI

3.1 QUADRO DI RIFERIMENTO INTERNAZIONALE

Durante l'ottavo Congresso Internazionale dell'IRPA (*International Radiation Protection Association*) tenutosi a Montreal, 18-22 maggio 1992, fu costituita una nuova organizzazione scientifica indipendente, la Commissione Internazionale per la Protezione dalle Radiazioni Non Ionizzanti (*International Commission on Non Ionizing Radiation Protection*) **ICNIRP**, che succedesse all'IRPA/INIRC. L'ICNIRP è un gruppo indipendente di esperti, che è stato costituito per valutare lo stato delle conoscenze relative agli effetti delle NIR sulla salute e sul benessere dell'uomo nonché per fornire, quando è il caso, raccomandazioni su basi scientifiche per la protezione dalle radiazioni non ionizzanti, ivi compresa l'emanazione di linee guida per la limitazione delle esposizioni. L'ICNIRP è, per quanto riguarda la protezione dalle NIR, l'organizzazione non governativa formalmente riconosciuta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), dall'Organizzazione Internazionale del Lavoro (ILO) e dall'Unione Europea (UE). Nel 1998 l'ICNIRP pubblicò le “*Linee Guida per la limitazione dell'esposizione a campi elettrici e magnetici variabili nel tempo ed a campi elettromagnetici (fino a 300 GHz)*”; l'obiettivo principale di questa pubblicazione è quello di stabilire delle linee guida per la limitazione dell'esposizione ai campi elettromagnetici, in modo da fornire una protezione contro effetti conosciuti che siano nocivi per la salute.

A seguito della valutazione della letteratura è possibile identificare gli effetti di danno alla salute da esposizioni a NIR che sono ritenuti come ben accertati. L'esistenza di questi effetti delle NIR costituisce la base logico-scientifica per le linee guida di esposizione dell'ICNIRP. La strategia generale dell'ICNIRP consiste nel definire una *restrizione di base* in termini della grandezza biologicamente efficace e collegare questa restrizione a dei *livelli di riferimento*, espressi in termini di grandezze direttamente misurabili per l'esposizione esterna:

- **restrizioni di base:** limitazioni alle esposizioni ai campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici variabili nel tempo basate direttamente su effetti sanitari accertati. Sono limitazioni strettamente legate ai meccanismi biologici che si riscontrano in seguito ad esposizione e vengono sviluppati in termini di grandezza biologicamente

efficace. Secondo la frequenza le grandezze fisiche usate per specificare queste restrizioni sono principalmente la densità di corrente (**J**), il tasso di assorbimento specifico di energia (**SAR**) e la densità di potenza (**S**).

- **livelli di riferimento:** questi livelli vengono forniti per una valutazione pratica dell'esposizione, al fine di stabilire se le restrizioni di base siano verosimilmente rispettate. Sono i più facili da valutare e da collegare ai livelli di emissione delle sorgenti. Alcuni livelli di riferimento sono derivati dalle appropriate restrizioni di base mediante misure e/o tecniche numeriche, mentre altri tengono conto degli effetti di percezione o degli effetti indiretti dell'esposizione a campi elettromagnetici. Le grandezze fisiche derivate sono l'intensità del campo elettrico (E), l'intensità del campo magnetico (H), l'induzione magnetica (B), la densità di potenza (S) e la corrente che fluisce attraverso le estremità (I_L).

In questo modo, è possibile esprimere un livello (livello di riferimento) in termini di una metrica di esposizione esterna. Ciò permette di sviluppare strategie di riduzione dell'esposizione basate sulle restrizioni di base ma praticamente realizzate attraverso i livelli di riferimento. L'uso dei livelli di riferimento assicura il rispetto delle restrizioni di base sull'esposizione, perché le relazioni tra le due grandezze sono state sviluppate facendo riferimento a situazioni di massimo assorbimento o a condizioni di massimo accoppiamento tra la radiazione esterna, o il campo esterno, e la persona esposta (ipotesi del caso peggiore). Il rispetto dei livelli di riferimento garantisce quello della corrispondente restrizione di base. Se, al contrario, il valore misurato o calcolato supera il livello di riferimento, non ne consegue necessariamente che venga violata la restrizione di base. Comunque, ogni volta che 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.

Queste linee guida per la limitazione delle esposizioni sono state sviluppate dopo un'accurata revisione di tutta la letteratura scientifica pubblicata. Solo gli effetti accertati sono stati utilizzati come base per le restrizioni qui proposte. Si è giudicato che l'induzione di tumori per effetto di esposizioni a lungo termine a campi elettromagnetici non sia stata accertata e pertanto queste linee guida si basano sugli effetti sanitari immediati delle esposizioni a breve termine, come stimolazione dei nervi periferici e dei muscoli, scosse e ustioni derivanti dal contatto con oggetti conduttori o innalzamenti della temperatura dei tessuti in conseguenza dell'assorbimento di energia durante l'esposizione a campi

elettromagnetici. Per ciò che riguarda potenziali effetti a lungo termine, come un aumento del rischio di cancro, l'ICNIRP ha concluso che i dati disponibili costituiscono una base insufficiente per stabilire delle restrizioni all'esposizione, anche se la ricerca epidemiologica ha fornito dei dati che suggeriscono, ma in modo non convincente, un'associazione tra possibili effetti cancerogeni e l'esposizione a livelli di induzione magnetica a 50/60 Hz che sono molto inferiori a quelli raccomandati in queste linee guida.

Le restrizioni di base sulla densità di corrente, sul SAR mediato sul corpo intero e sul SAR localizzato, per frequenze comprese tra 1 Hz e 10 GHz, sono presentate nella tabella 2, mentre le restrizioni sulla densità di potenza nell'intervallo di frequenza tra 10 GHz e 300 GHz sono presentati nella tabella 3:

Tabella 2. Restrizioni di base per campi elettrici e magnetici variabili nel tempo con frequenze fino a 10 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/ <i>f</i>	-	-	-
	4 Hz-1 kHz	10	-	-	-
	1-100 kHz	<i>f</i> /100	-	-	-
	100 kHz-10 MHz	<i>f</i> /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/ <i>f</i>	-	-	-
	4 Hz-1 kHz	2	-	-	-
	1-100 kHz	<i>f</i> /500	-	-	-
	100 kHz-10 MHz	<i>f</i> /500	0,08	2	4
	10 MHz-10 GHz	-	0,08	2	4

Note:

- *f* è la frequenza in Hz.

Tabella 3. Restrizioni di base per la densità di potenza per frequenze comprese tra 10 e 300 GHz.

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

Le tabelle 4 e 5 riassumono i livelli di riferimento per l'esposizione professionale e per quella del pubblico generico. I livelli di riferimento devono intendersi come valori

mediati sull'intero corpo dell'individuo esposto, ma con l'importante avvertenza che non devono comunque essere superati i limiti di base per l'esposizione localizzata.

Tabella 4. Livelli di riferimento per l'esposizione professionale a campi elettrici e magnetici.

Intervallo di frequenza	Intensità del campo elettrico (V/m)	Intensità del campo magnetico (A/m)	Induzione magnetica (μT)	Densità di potenza dell'onda piana equivalente (W/m ²)
fino a 1 Hz	-	$1,63 \times 10^5$	2×10^5	-
1-8 Hz	20.000	$1,63 \times 10^5/f^2$	$2 \times 10^5/f^2$	-
8-25 Hz	20.000	$2 \times 10^4/f$	$2,5 \times 10^4/f$	-
0,025-0,82 kHz	$500/f$	$20/f$	$25/f$	-
0,82-65 kHz	610	24,4	30,7	-
0,065-1 MHz	610	$1,6/f$	$2,0/f$	-
1-10 MHz	$610/f$	$1,6/f$	$2,0/f$	-
10-400 MHz	61	0,16	0,2	10
400-2000 MHz	$3f^{1/2}$	$0,008f^{1/2}$	$0,01f^{1/2}$	$f/40$
2-300 GHz	137	0,36	0,45	50

Tabella 5. Livelli di riferimento per l'esposizione del pubblico a campi elettrici e magnetici.

Intervallo di frequenza	Intensità del campo elettrico (V/m)	Intensità del campo magnetico (A/m)	Induzione magnetica (μT)	Densità di potenza dell'onda piana equivalente (W/m ²)
fino a 1 Hz	-	$3,2 \times 10^4$	4×10^4	-
1-8 Hz	10.000	$3,2 \times 10^4/f^2$	$4 \times 10^4/f^2$	-
8-25 Hz	10.000	$4.000/f$	$5.000/f$	-
0,025-0,8 kHz	$250/f$	$4/f$	$5/f$	-
0,8-3 kHz	$250/f$	5	6,25	-
3-150 kHz	87	5	6,25	-
0,15-1 MHz	87	$0,73/f$	$0,92/f$	-
1-10 MHz	$87/f^{1/2}$	$0,73/f$	$0,92/f$	-
10-400 MHz	28	0,073	0,092	2
400-2000 MHz	$1,375f^{1/2}$	$0,0037f^{1/2}$	$0,0046f^{1/2}$	$f/200$
2-300 GHz	61	0,16	0,20	10

Note:

- f è espressa nelle unità indicate nella prima colonna.

- i valori delle intensità di campo possono essere superati purchè siano rispettate le prescrizioni di base e si possano escludere effetti indiretti.

3.2 QUADRO DI RIFERIMENTO DELLA COMUNITA' EUROPEA

Nel trattato istitutivo della Comunità Europea l'art. 174 è il pilastro fondamentale su cui verte la politica ambientale comunitaria. In esso sono indicati i principali obiettivi della CE in tema di salvaguardia ambientale, i principi sui cui essa si fonda e gli strumenti utilizzati per l'attuazione della politica in materia ambientale.

La politica ambientale della CE contribuisce a perseguire i seguenti obiettivi:

- a) Salvaguardia, tutela e miglioramento dell'ambiente
- b) Protezione della salute umana
- c) Utilizzazione accorta e razionale delle risorse naturali
- d) Promozione sul piano internazionale di misure destinate a risolvere i problemi dell'ambiente a livello regionale o mondiale.

La politica della Comunità in materia ambientale è inoltre fondata sul *principio di precauzione* e dell'azione preventiva, sul principio di correzione in via prioritaria alla fonte dei danni provocati all'ambiente, nonché sul principio "chi inquina paga". Nel predisporre la sua politica ambientale la Comunità tiene conto dei dati scientifici e tecnici disponibili, delle condizioni dell'ambiente nelle varie regioni della Comunità, dei vantaggi e degli oneri che possono derivare dall'azione o dall'assenza di azione, dello sviluppo socio-economico della Comunità nel suo insieme e dello sviluppo equilibrato delle singole regioni.

Di ampia portata è la Risoluzione "Sulla lotta contro gli inconvenienti provocati dalle radiazioni non ionizzanti" approvata dal Parlamento Europeo il 5 maggio del 1994. Con essa si chiede alla Commissione e al Consiglio di definire una strategia basata su cambiamenti tecnologici e strutturali volta ad arginare l'inquinamento elettromagnetico provocato da:

- Trasporto e distribuzione di elettricità
- Apparecchiature elettrodomestiche
- Tecnologie utilizzate nelle industrie e nei servizi
- Telecomunicazioni

Nel medesimo documento viene altresì programmato un rapido intervento normativo, dal momento che "le difficoltà di evidenziare una relazione dose-effetto non impediscono di adottare misure legislative volte a creare un sistema di limitazione all'esposizione dei lavoratori e del pubblico, che tenga conto della possibilità offerta dal trattamento del problema alla fonte e dal ricorso alla generazione di energia decentralizzata". E' il caso di ricordare i due principi generali richiamati in questa

Risoluzione. Più in particolare, durante la seduta dell'11 aprile 1994, nella quale è stata approvata la Proposta di risoluzione in esame, il Parlamento europeo ha fissato due principi direttori:

- il *principio di precauzione*, per il quale, in caso di dubbio sul livello del rischio, occorre adottare l'impostazione più garantista per la salute del cittadino, consistente nel minimizzare detto rischio, ricorrendo, eventualmente, all'opzione zero;
- quello dell'esposizione ai campi magnetici *As Low Reasonably Achievable* (criterio ALARA), secondo cui, una volta fatta la scelta tecnologica, l'esposizione alle radiazioni deve essere la più debole possibile.

Il *principio di precauzione* è una politica di gestione del rischio che viene applicata in circostanze caratterizzate da un alto grado di incertezza scientifica, e riflette la necessità di intervenire nei confronti di un rischio potenzialmente grave senza attendere i risultati della ricerca scientifica. Laddove sia incerta l'esistenza o l'entità dei rischi per la salute umana, la Commissione può adottare misure di protezione senza dover aspettare che venga accertata la realtà o la gravità di tali rischi. Il 2 febbraio del 2000 la Commissione Europea ha approvato un importante comunicato sul principio di precauzione, fornendo linee guida per la sua applicazione. In base a tale comunicato i provvedimenti basati sul principio di precauzione dovrebbero essere:

- adatti ai livelli di protezione scelti,
- non discriminatori nella loro applicazione, dovrebbero cioè trattare situazioni confrontabili alla stessa maniera,
- coerenti con altri provvedimenti già presi,
- basati sui potenziali benefici e costi di azioni fatte o mancate,
- di natura provvisoria,
- in grado di assegnare la responsabilità della produzione delle prove scientifiche per una più completa valutazione dei rischi.

E' di notevole importanza capire che ad oggi, in materia di inquinamento elettromagnetico, data l'incertezza sui possibili effetti biologici e sanitari dei campi, ogni tipo di politica ambientale intrapresa in termini di limitazioni delle esposizioni, restrizioni di base o livelli di riferimento è strettamente dipendente dal principio di precauzione.

ALARA è l'acronimo dell'inglese **As Low As Reasonably Achievable** (il più basso ragionevolmente raggiungibile). È una politica atta a minimizzare rischi conosciuti, mantenendo l'esposizione ai livelli più bassi ragionevolmente possibili tenendo in

considerazione i costi, la tecnologia, i benefici per la salute pubblica ed altri fattori sociali ed economici. Oggi, il principio ALARA è usato soprattutto nel contesto della protezione dalle *radiazioni ionizzanti*, dove i limiti non sono stabiliti sulla base di una soglia, ma piuttosto sulla base di un “rischio accettabile”. In queste circostanze, è ragionevole minimizzare un rischio che si presume possa esistere anche a livelli inferiori ai limiti raccomandati, considerato che ciò che costituisce un rischio accettabile può variare molto da individuo a individuo. Il principio ALARA non è stato finora applicato per stabilire politiche nei confronti dell’esposizione a campi elettromagnetici non ionizzanti. In effetti, esso non costituisce una politica appropriata per questi campi (che si tratti di linee elettriche o di campi a radiofrequenza), data l’assenza di qualunque valore di rischio atteso a bassi livelli di esposizione e data l’ubiquità dell’esposizione stessa.

Un requisito di principio è che tali politiche siano adottate solo a condizione che valutazioni di rischio e limiti di esposizione fondati su basi scientifiche non siano minati dall’adozione di approcci cautelativi arbitrari. Ciò si verificherebbe, ad esempio, se i valori limite venissero abbassati fino a livelli tali da non avere alcuna relazione con i rischi accertati, o se fossero modificati in modo improprio ed arbitrario per tener conto delle incertezze scientifiche.

Nel 1999 la Comunità Europea emanò la Raccomandazione 1999/512/CE “*Raccomandazione del consiglio relativa alla limitazione dell’esposizione della popolazione ai campi elettromagnetici da 0 a 300 GHz*”. Obiettivo della suddetta è l’istituzione attraverso raccomandazioni rivolte agli Stati membri, di un quadro comunitario per quanto concerne l’esposizione ai campi elettromagnetici in un’ottica di protezione della popolazione; pertanto essa si applica in particolare ai luoghi in cui singoli cittadini permangono per un tempo significativo rispetto agli effetti contemplati dalla presente raccomandazione. Gli stati membri hanno comunque facoltà di fornire un livello di protezione più elevato di quello indicato nella Raccomandazione stessa. Da un punto di vista tecnico essa riprende integralmente le linee guida dell’ICNIRP raccomandando agli stati membri di attribuire alle grandezze fisiche che figurano nell'allegato I.A il significato ivi indicato; di adottare un quadro di limiti fondamentali e di livelli di riferimento che utilizzi l'allegato I.B come base; di proporsi l'obiettivo di conformarsi ai limiti fondamentali che figurano nell'allegato II per l'esposizione della popolazione; di tenere conto dei livelli di riferimento forniti dall'allegato III ai fini della valutazione dell'esposizione.

Nel 2004 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 dai rischi derivanti dagli agenti fisici (campi elettromagnetici)*”. Come definito nelle disposizioni generali, *art. 1*, la presente direttiva riguarda i rischi per la salute e la sicurezza dei lavoratori dovuti agli effetti nocivi a breve termine conosciuti nel corpo umano, derivanti dalla circolazione di correnti indotte e dall'assorbimento di energia, nonché da correnti di contatto. Essa riprende i limiti di base e i livelli di riferimento per l'esposizione professionale forniti dall'ICNIRP.

Tuttavia con la direttiva comunitaria 2008/46/CE del 23 aprile 2008, la Commissione Europea ha annunciato la proroga dell'attuazione della direttiva 2004/40/CE sugli agenti fisici. Questa proposta modifica la data di recepimento della direttiva 2004/40/CE al 30 aprile 2012, al fine di concedere il tempo necessario alla preparazione di un testo rettificato che tenga in maggiore considerazione alcune tecnologie che fanno uso di campi statici o a bassissima frequenza, come la risonanza magnetica per immagini (MRI).

3.3 *NORMATIVA ITALIANA*

La normativa di riferimento nazionale si basa sulla **Legge 22 febbraio 2001 n. 36**, “*Legge Quadro sulla protezione dalle esposizioni a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici*”. La presente legge ha lo scopo di dettare i principi fondamentali diretti a:

- assicurare la tutela della salute dei lavoratori/lavoratrici e della popolazione dagli effetti dell'esposizione a determinati livelli di campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici ai sensi e nel rispetto dell'art. 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.

Nell'*ambito di applicazione* viene indicato che la 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, delle lavoratrici e della popolazione a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenze comprese tra 0 Hz e 300 GHz. In

particolare, la presente legge si applica agli elettrodotti ed agli impianti radioelettrici compresi gli impianti per telefonia mobile, i radar e gli impianti per radiodiffusione. Le disposizioni della presente legge non si applicano nei casi di esposizione intenzionale per scopi diagnostici o terapeutici.

Ai fini dell'applicazione si assumono le seguenti *definizioni* (art.3):

- *esposizione*: è la condizione di una persona soggetta a campi elettrici, magnetici, elettromagnetici, o a correnti di contatto, di origine artificiale;
- *limite di esposizione*: è il valore di campo elettrico, magnetico ed elettromagnetico, considerato come valore di immissione, definito ai fini della tutela della salute da effetti acuti, che non deve essere superato in alcuna condizione di esposizione della popolazione e dei lavoratori;
- *valore di attenzione*: è il valore di campo elettrico, magnetico ed elettromagnetico, considerato come valore di immissione, che non deve essere superato negli ambienti abitativi, scolastici e nei luoghi adibiti a permanenze prolungate. Esso costituisce misura di cautela ai fini della protezione da possibili effetti a lungo termine e deve essere raggiunto nei tempi e nei modi previsti dalla legge;
- *obiettivi di qualità* sono:
 - 1) i criteri localizzativi, gli standard urbanistici, le prescrizioni e le incentivazioni per l'utilizzo delle migliori tecnologie disponibili, indicati dalle leggi regionali;
 - 2) i valori di campo elettrico, magnetico ed elettromagnetico, definiti dallo Stato ai fini della progressiva minimizzazione dell'esposizione ai campi medesimi.

L'art. 4 della legge definisce le *funzioni* dello Stato, il quale si occupa principalmente della determinazione di limiti di esposizione, valori di attenzione e obiettivi di qualità; inoltre promuove le attività di ricerca e di sperimentazione tecnico-scientifica, nonché l'attività di raccolta, elaborazione e diffusione dei dati; l'istituzione del catasto nazionale delle sorgenti fisse e mobili di campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici nelle zone territoriali interessate e l'individuazione delle tecniche di misurazione e rilevamento dell'inquinamento elettromagnetico. Sono invece di competenza delle regioni l'esercizio delle funzioni relative all'individuazione dei siti di trasmissione e degli impianti per telefonia mobile, degli impianti radioelettrici e per radiodiffusione; la definizione dei tracciati per gli elettrodotti con tensione non superiore a 150 kV; l'individuazione degli

strumenti e delle azioni per il raggiungimento degli obiettivi di qualità e la definizione delle competenze che spettano a province e comuni (*art. 8*). Le amministrazioni provinciali e comunali, al fine di esercitare le funzioni di controllo e di vigilanza sanitaria e ambientale, utilizzano le strutture delle Agenzie regionali per la protezione dell' ambiente e spesso di avvalgono anche del supporto tecnico di istituti come l'ISPEL (Istituto Superiore per la Prevenzione e Sicurezza sul Lavoro).

Successivamente alla legge quadro 36/2001 è stato emanato il decreto applicativo della suddetta legge. Con il **D.P.C.M. 8 luglio 2003** "*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*" lo stato italiano si impegna a fissare i limiti di esposizione e i valori di attenzione per la prevenzione degli effetti a breve termine e dei possibili effetti a lungo termine nella popolazione, dovuti all' esposizione ai campi elettromagnetici generati da sorgenti fisse con frequenza compresa tra 100 kHz e 300 GHz. Il presente decreto fissa inoltre gli obiettivi di qualità, ai fini della progressiva minimizzazione della 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 di cui al presente decreto non si applicano ai lavoratori esposti per ragioni professionali oppure per esposizioni a scopo diagnostico o terapeutico.

Nell'*art 2* del D.P.C.M. vengono confermate le definizioni di cui all'*art. 3* della legge 22 febbraio 2001 n.36 riguardo le grandezze fisiche e i limiti di esposizione, nonché i valori di attenzione.

Limiti di esposizione e valori di attenzione (art.3): Nel caso di esposizione a impianti che generano campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenza compresa tra 100 kHz e 300 GHz, non devono essere superati i limiti di esposizione riportati nella tabella 6.

Tabella 6. Limiti di esposizione a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenza compresa tra 100 kHz e 300 GHz.

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

A titolo di misura di cautela per la protezione da possibili effetti a lungo termine eventualmente connessi con le esposizioni ai campi generati alle suddette frequenze all'interno di edifici adibiti a permanenze non inferiori a quattro ore giornaliere, e loro pertinenze esterne, che siano fruibili come ambienti abitativi quali balconi, terrazzi e cortili esclusi i lastrici solari, si assumono i valori di attenzione indicati nella tabella 7:

Tabella 7. Valori di attenzione riferiti all'esposizione a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenza compresa tra 100 kHz e 300 GHz.

Valori di attenzione	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 (3 MHz – 300 GHz)

Obiettivi di qualità (art. 4): ai fini della progressiva minimizzazione della esposizione ai campi elettromagnetici, i valori di immissione dei campi oggetto del presente decreto, calcolati o misurati all'aperto nelle aree intensamente frequentate, non devono superare i valori indicati nella tabella 8:

Tabella 8. Obiettivi di qualità riferiti all'esposizione a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici con frequenza compresa tra 100 kHz e 300 GHz.

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 (3 MHz – 300 GHz)

Lo stesso decreto applicativo è stato formulato anche per i campi a frequenza estremamente bassa, **D.P.C.M. 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 e magnetici alla frequenza di rete (50 Hz) generati dagli elettrodotti*”. Le disposizioni del presente decreto fissano limiti di esposizione e valori di attenzione per la protezione della popolazione dalle esposizioni a campi elettrici e magnetici alla frequenza di rete (50 Hz) connessi al funzionamento e all'esercizio degli elettrodotti. Nel medesimo ambito, il presente decreto stabilisce anche un obiettivo di qualità per il campo magnetico, ai fini della progressiva minimizzazione delle esposizioni. I limiti di esposizione, i valori di attenzione e gli obiettivi di qualità di cui al presente

decreto non si applicano ai lavoratori esposti per ragioni professionali. A tutela delle esposizioni a campi a frequenze comprese tra 0 Hz e 100 kHz, generati da sorgenti non riconducibili agli elettrodotti, si applica l'insieme completo delle restrizioni stabilite nella raccomandazione del Consiglio dell'Unione europea del 12 luglio 1999.

Limiti di esposizione e valori di attenzione (art. 3): nel caso di esposizione a campi elettrici e magnetici alla frequenza di 50 Hz generati da elettrodotti, non deve essere superato il limite di esposizione di **100 μT** per l'induzione magnetica e **5 kV/m** per il campo elettrico, intesi come valori efficaci. A titolo di misura di cautela per la protezione da possibili effetti a lungo termine, eventualmente connessi con l'esposizione ai campi magnetici generati alla frequenza di rete (50 Hz), nelle aree gioco per l'infanzia, in ambienti abitativi, in ambienti scolastici e nei luoghi adibiti a permanenze non inferiori a quattro ore giornaliere, si assume per l'induzione magnetica il valore di attenzione di **10 μT** , da intendersi come mediana dei valori nell'arco delle 24 ore nelle normali condizioni di esercizio.

Obiettivi di qualità (art. 4): nella progettazione di nuovi elettrodotti in corrispondenza di aree gioco per l'infanzia, di ambienti abitativi, di ambienti scolastici e di luoghi adibiti a permanenze non inferiori a quattro ore e nella progettazione dei nuovi insediamenti e delle nuove aree di cui sopra in prossimità di linee ed installazioni elettriche già presenti nel territorio, ai fini della progressiva minimizzazione dell'esposizione ai campi elettrici e magnetici generati dagli elettrodotti operanti alla frequenza di 50 Hz, è fissato l'obiettivo di qualità di **3 μT** per il valore dell'induzione magnetica, da intendersi come mediana dei valori nell'arco delle 24 ore nelle normali condizioni di esercizio. I limiti di esposizione, i valori di attenzione e gli obiettivi di qualità fissati dal suddetto Decreto sono riassunti in tabella 9:

Tabella 9. Limiti di esposizione, valori di attenzione e obiettivi di qualità per esposizione a campi alla frequenza di rete di 50 Hz (elettrodotti).

	Campo elettrico (kV/m)	Induzione magnetica (μT)
Limite di esposizione	5	100
Valore di attenzione	-	10
Obiettivo di qualità	-	3

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". Con la presente il Governo è delegato ad adottare, entro nove mesi dalla data di entrata in vigore della legge, uno o piu' decreti legislativi per il riassetto e la riforma delle disposizioni vigenti in materia di salute e sicurezza dei lavoratori nei luoghi di lavoro, in conformità all'articolo 117 della Costituzione e agli statuti delle regioni a statuto speciale e delle province autonome di Trento e di Bolzano, e alle relative norme di attuazione, e 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 alla condizione delle lavoratrici e dei lavoratori immigrati. In attuazione della Legge 3 agosto 2007 n. 123 è stato emanato il **Decreto Legislativo 9 aprile del 2008 n. 81** "*Attuazione dell'art. 1 della legge 3 agosto 2007 in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro*" nel quale vengono definiti i criteri di applicazione della legge n. 123. Ai fini del presente decreto legislativo per agenti fisici si intendono il rumore, gli ultrasuoni, gli infrasuoni, le vibrazioni meccaniche, i campi elettromagnetici, le radiazioni ottiche di origine artificiale, il microclima e le atmosfere iperbariche che possono comportare rischi per la salute e la sicurezza dei lavoratori. Nell'ambito della valutazione del rischio il datore di lavoro valuta tutti i rischi derivanti da esposizioni ad agenti fisici in modo da identificare ed adottare le opportune misure di prevenzione e protezione. In nessun caso i lavoratori devono essere esposti a valori superiori ai valori limite di esposizione, che nel caso dei campi elettromagnetici, rimangono quelli suggeriti dalla Raccomandazione 1999/512/CE.

3.4 NORMATIVA REGIONALE EMILIA-ROMAGNA

Sulla base del frenetico sviluppo di impianti per la produzione e trasmissione di energia elettrica, nonché la diffusione di nuovi strumenti di telecomunicazione quali emittenti radio-televisive e sistemi per la telefonia mobile, e in assenza di un quadro normativo organico di riferimento la Regione Emilia-Romagna ha deciso di accelerare i tempi pubblicando sul BUR del novembre 2000, n. 154 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 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 stabiliscono norme per perseguire in via prioritaria la prevenzione e la tutela sanitaria della popolazione e la salvaguardia dell'ambiente dall'inquinamento elettromagnetico coordinandole con le scelte della pianificazione urbanistica. La localizzazione delle emittenti radio, di quelle televisive, degli impianti di telefonia mobile, ivi compresi gli impianti del sistema dect, e delle linee ed impianti elettrici per il rispetto dei valori di cautela fissati nella normativa statale e per 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.

Per quanto riguarda gli impianti per telefonia mobile i gestori presentano ai Comuni il Programma annuale delle installazioni fisse da realizzare. Il Programma annuale oltre a indicare la localizzazione puntuale degli impianti può individuare altresì le aree circoscritte, di ampiezza non superiore a 150 metri 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*). La legge vieta 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 L.R. n. 11 del 1998 nonché su edifici di valore storico-architettonico e monumentale (*art 9*). Viene inoltre istituito il catasto degli impianti fissi di telefonia mobile. Entro sei mesi dalla data di entrata in vigore della legge i gestori forniscono ai comuni la mappa completa degli impianti fissi già installati (*art 11*).

Per gli impianti di trasmissione e di distribuzione dell'energia elettrica vengono definite le linee e gli impianti elettrici o elettrodotti e la loro classificazione. Vengono inoltre fornite le definizioni di corridoio di fattibilità: porzione di territorio, di adeguata dimensione, destinata ad ospitare la localizzazione degli impianti elettrici previsti nei programmi di sviluppo delle reti tale da consentire la localizzazione di un tracciato tecnicamente realizzabile, tenuto anche conto della necessaria ricerca del consenso dei proprietari dei suoli e delle opere interferite. Fascia di rispetto: striscia o area di terreno le cui dimensioni, determinate in via cautelativa, sono correlate alla tipologia e tensione d'esercizio dell'impianto elettrico al fine di garantire il perseguimento dell'obiettivo di qualità di **0,2 μT** . Le fasce di rispetto trovano la loro rappresentazione grafica negli strumenti della pianificazione urbanistica comunale. Obiettivo di Qualità: l'obiettivo 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, fermo restando la tutela della salute garantita attraverso il rispetto di opportuni valori di cautela e limiti di esposizione. Per alcune situazioni territoriali che prevedano 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 ove si manifesti la necessità di potenziare la rete elettrica in aree fortemente urbanizzate, la determinazione di un obiettivo di qualità rappresentato da un valore meno restrittivo di $0,2 \mu\text{T}$ troverà quindi il suo limite superiore nel rispetto del valore di cautela; pertanto in tali casi, si ritiene opportuno che gli **$0,5 \mu\text{T}$** rappresentino l'obiettivo di qualità minimo da perseguire. A questo proposito vengono inoltre 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 quindi realizzare gli impianti di trasmissione e distribuzione dell'energia elettrica. La fascia di rispetto viene definita per tutti gli impianti, costruiti od autorizzati, con tensione superiore o uguale a 15 kV in relazione alle caratteristiche della linea in modo tale che di norma, esternamente alla fascia, negli edifici e aree circostanti si realizzi l'obiettivo di qualità di $0,2 \mu\text{T}$ di induzione magnetica. I campi elettromagnetici generati dagli impianti per la trasmissione e distribuzione dell'energia elettrica dipendono dall'intensità della corrente elettrica, caratterizzata da un'elevata variabilità sia nell'arco della giornata che nei periodi dell'anno, nonché dal numero e dalla disposizione geometrica dei conduttori. Considerato che si possono identificare una serie di configurazioni standard delle varie tipologie di impianti, il dimensionamento delle fasce di rispetto diventa quindi strettamente correlato alla definizione della "corrente circolante". Al fine di dimensionare dette fasce si ritiene opportuno suddividere gli impianti per la trasmissione e distribuzione dell'energia elettrica in linee con tensione superiore a 35 kV e linee con tensione pari o inferiore a 35 kV, per le quali vengono definite le dimensioni della fascia laterale di rispetto per il conseguimento dell'obiettivo di qualità di $0,2 \mu\text{T}$ al ricevitore.

Dopo oltre sette anni di esercizio della legge 30/2000 si è reso necessario intervenire sulla norma e successivamente sulla direttiva applicativa, per introdurre elementi di semplificazione e per definire iter procedurali sulle nuove tecnologie di comunicazione elettronica. Con la **legge regionale del 6 marzo 2007 n. 4** recante "*Adeguamenti normativi in campo ambientale. Modifiche a leggi regionali*" sono stati

migliorati alcuni punti delle normative precedenti. Gli aspetti più significativi sono rappresentati dalla non assoggettabilità alla norma degli impianti di potenza inferiore ai 2 Watt, dalla soppressione dei vincoli localizzativi per gli impianti di collegamento punto-punto (ponti-radio), per i ripetitori di segnale degli impianti radio e televisivi e il rinvio di un'apposita direttiva per la definizione delle procedure autorizzative delle nuove tecnologie. L'anno seguente il **Dgr n. 1138 del 21 luglio 2008** "*Modifiche ed integrazioni alla DGR 20 maggio 2001, n. 197 Direttiva per l'applicazione della legge regionale 31 ottobre 2000 n. 30*" ha previsto per gli impianti fissi di telefonia mobile il ricorso all'autorizzazione singola, in considerazione del fatto che le reti dei quattro gestori risultano ormai completate, i due principali gestori (Telecom e Vodafone) hanno stipulato un contratto quadro di condivisione dei siti e, in generale, le richieste avanzate dai gestori in questi ultimi anni hanno riguardato singole installazioni per zone a limitata copertura e riconfigurazioni di impianti esistenti.

3.5 IL RUOLO DELL'ARPA EMILIA-ROMAGNA NEL MONITORAGGIO DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI

La gestione della rete di monitoraggio dei campi elettromagnetici ad alta frequenza è un'importante attività di ARPA (*agenzia regionale per la protezione dell'ambiente*) che si affianca a quella tradizionale di ispezione e vigilanza svolta tramite rilievi puntuali, permettendo di tenere costantemente sotto controllo diverse aree del territorio antropizzato, caratterizzato dalla presenza concomitante di molteplici fattori di pressione. La rete di monitoraggio dei campi elettromagnetici ad alta frequenza gestita da ARPA è attiva sul territorio regionale dal 2002 e la sua realizzazione ha precisi riferimenti normativi. La L.R. 30/00 prevede infatti all'art. 19 che "la Regione e gli Enti locali favoriscano la ricerca, lo sviluppo e l'applicazione di tecnologie che consentano di minimizzare le emissioni degli impianti ovvero realizzare sistemi di monitoraggio in continuo delle sorgenti", con la possibilità di stipulare intese ed accordi di programma con i soggetti gestori. A partire dal 2003, la rete regionale si è integrata a livello nazionale con la rete di monitoraggio nazionale dei campi elettromagnetici, coordinata dalla Fondazione Ugo Bordoni (FUB), su finanziamento del Ministero delle Comunicazioni ed in base al DPCM 28/03/02 ed alla L. 3/03, gestita operativamente dalle Agenzie Regionali per l'Ambiente tramite apposite convenzioni. In generale il monitoraggio in continuo dei campi elettromagnetici ad alta frequenza risponde ai seguenti obiettivi:

- analisi della variabilità temporale;
- analisi di situazioni complesse, ad es. per la presenza di molteplici sorgenti che variano nel tempo in modo indipendente e di elementi di perturbazione;
- monitoraggio di aree estese;
- ottimizzazione della pianificazione degli interventi;
- maggiore visibilità dei dati;

La rete di monitoraggio regionale dei campi elettromagnetici ad alta frequenza è costituita da "stazioni di misura" o "centraline" in continuo ricollocabili sul territorio, distribuite nelle nove province, che rilevano in continuo i livelli di campo elettrico presenti e loro variazioni nel tempo, e da centrali operative per la gestione delle stazioni periferiche e l'acquisizione, validazione, elaborazione, presentazione e diffusione in ambito locale dei dati rilevati ("centri di controllo locali", installati nelle nove Sezioni provinciali Arpa). Il sistema è integrato a livello superiore tramite un "centro di controllo regionale", situato presso il Servizio Sistemi Informativi a Bologna, che provvede all'archiviazione sistematica dei dati in un database unico ed alla diffusione dei risultati del monitoraggio attraverso Internet. La scelta dei siti di monitoraggio avviene di norma in accordo con le Amministrazioni competenti per territorio, con priorità per i siti ritenuti più critici (per numero e tipologia di impianti presenti) o più delicati (asili, scuole, etc). Le campagne di monitoraggio hanno in genere una durata variabile da un minimo di una settimana ad un massimo di due o tre mesi, in base alla criticità dei valori rilevati, e alla variabilità delle sorgenti ed alla disponibilità delle strutture ospitanti.

SCOPO DELLA TESI

Il rapido sviluppo di tecnologie che generano campi elettromagnetici è stato accompagnato da preoccupazioni per i loro possibili effetti sulla salute. Alla base di queste preoccupazioni vi sono i risultati di alcuni studi che hanno suggerito la possibilità di effetti a lungo termine, come lo sviluppo di tumori e malattie degenerative, in conseguenza di esposizioni croniche a livelli anche molto bassi di esposizione. Gli studi epidemiologici non hanno evidenziato una relazione tra l'esposizione a campi elettromagnetici ed effetti dannosi sulla salute; ciononostante numerose evidenze di laboratorio hanno messo in luce alterazioni a livello cellulare e/o molecolare. Queste tuttavia sono molto variabili in relazione al diverso tipo di cellula o al diverso tipo di segnale incidente. Sulla base del fatto che è molto difficile distinguere un piccolo effetto dalla mancanza di effetti, non esiste al momento la certezza che i campi elettromagnetici siano davvero privi di effetti biologici. Per questo motivo la ricerca scientifica prosegue, al fine di ottimizzare i criteri di analisi, produrre dati di una certa ripetibilità e sviluppare linee guida per la protezione della popolazione basate su una robusta rilevanza scientifica.

Lo scopo di questo lavoro di Tesi è stato contribuire allo studio degli effetti biologici dei campi elettromagnetici valutando l'attività e l'espressione dell'enzima acetilcolinesterasi in cellule in coltura esposte a tre diverse tipologie di segnale ad alta frequenza (CW, GSM 217 Hz AM, GSM Talk) a cui lavorano comunemente gli apparati per telefonia mobile (1.8 GHz). Parte integrante del lavoro è stata anche la messa a punto di alcune metodiche analitiche non utilizzate in precedenza presso il Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale del CIRSA di Ravenna. Inoltre è stato analizzato lo "stato dell'arte" sui problemi riguardanti gli effetti biologici e sanitari dei campi elettromagnetici, ponendo particolare enfasi anche sulle principali normative che regolano l'inquinamento elettromagnetico.

Il target verso cui sono stati svolti gli esperimenti è stata la linea cellulare PC12. Queste cellule derivano dal feocromocitoma di ratto, un tumore che si origina nella midollare del surrene. Tra le caratteristiche principali di questa linea cellulare vi è la secrezione dell'acetilcolina e dell'enzima che si occupa della sua degradazione, l'*acetilcolinesterasi*.

Lo studio si è concentrato proprio su questo enzima in quanto di cruciale importanza per la trasmissione dell'impulso nervoso e ipotizzato in numerosi studi come sensibile ai campi elettromagnetici. Sono presenti in letteratura numerosi risultati ottenuti

su varie tipologie cellulari esposte a campi elettromagnetici di diversa natura, dai quali si ricavano però risultati contraddittori. Infatti è stato osservato che nelle diverse cellule analizzate l'attività dell'enzima risultava aumentata, diminuita o rimaneva costante a fronte della esposizione a campi elettromagnetici.

Dal punto di vista fisiopatologico, un'alterazione dell'attività dell'AChE potrebbe essere correlata a disturbi neuronali quali alterazione della memoria o della capacità di apprendimento, spesso suggeriti come possibili conseguenze dell'esposizione a campi. Inoltre, la valutazione delle risposte dell'enzima AChE in seguito all'esposizione a campi elettromagnetici potrebbe fornire chiarimenti circa le interazioni molecolari tra i campi e i tessuti biologici. L'ottenimento di delucidazioni su questi aspetti è un obiettivo importante della ricerca scientifica.

Questo studio in particolare ha cercato di caratterizzare eventuali variazioni dell'enzima acetilcolinesterasi sia nella sua attività che nella sua espressione proteica e genica. A nostra conoscenza, questo è il primo studio in cui vengono analizzati tutti e tre i parametri in cellule esposte a campi elettromagnetici. Infatti il lavoro ha previsto analisi enzimatiche volte a definire se e in quale misura l'attività dell'enzima venisse condizionata dall'esposizione delle cellule a campi elettromagnetici ad alta frequenza; in secondo luogo si è cercato di valutare se le eventuali modifiche dell'attività enzimatica fossero riconducibili ad un'alterata espressione proteica dello stesso. Infine, per avere un quadro più organico del problema, si è cercato di valutare attraverso tecniche di biologia molecolare, se fossero riscontrabili anomalie anche a livello di trascrizione genica, andando ad indagare l'espressione del gene che sta a monte del processo di sintesi dell'enzima acetilcolinesterasi.

4. SISTEMI BIOLOGICI DI STUDIO

4.1 IL RUOLO DELL'ACETILCOLINA (ACh) ALL'INTERNO DELLE SINAPSI CHIMICHE

L'ACh è un neurotrasmettitore chimico, ossia una molecola che ha il ruolo di mediatore chimico nella trasmissione del segnale nervoso tra due neuroni, o tra neuroni e altri tipi cellulari (muscoli, ghiandole ecc.). Per trasmissione del segnale si intende un'insieme di complessi meccanismi che avvengono all'interno del sistema nervoso degli animali, in seguito alla ricezione di informazioni relative all'ambiente interno ed esterno dell'organismo. Questi meccanismi sono mediati principalmente da una rete di cellule, i *neuroni*, che ricevono tali informazioni, le integrano e informano altri tipi cellulari affinché rispondano in modo appropriato. I neuroni del sistema nervoso comunicano tra loro le informazioni mediante la trasmissione di un *potenziale d'azione*, ossia un evento per mezzo del quale una cellula nervosa o muscolare opportunamente stimolata (per es. con uno stimolo elettrico), subisce una variazione verso valori positivi del suo potenziale di membrana. I potenziali d'azione sono trasmessi da una cellula all'altra attraverso una struttura intercellulare specializzata, detta SINAPSI, la sede dove a tutti gli effetti il segnale nervoso viene trasmesso da una cellula (il neurone presinaptico) ad un'altra (il neurone o l'effettore postsinaptico) influenzandone il comportamento. Da un punto di vista funzionale, cioè in base alla modalità con cui si esplica la trasmissione, le sinapsi vengono distinte in:

- *sinapsi elettriche*, dove la trasmissione del segnale è mediata da un flusso di correnti elettrotoniche con un meccanismo identico a quello deputato alla propagazione dell'impulso lungo la fibra nervosa;
- *sinapsi chimiche*, dove la trasmissione è mediata da una sostanza chimica rilasciata dalla terminazione pre-sinaptica. Tra un neurone e l'altro c'è discontinuità; anche nelle sinapsi essi sono separati da uno spazio, lo *spazio sinaptico* (o *fessura sinaptica*) generalmente ampio da 20 a 30 nm.

Nei vertebrati la trasmissione sinaptica avviene prevalentemente con meccanismo chimico, richiede cioè la liberazione da parte dell'elemento presinaptico di una sostanza, il mediatore chimico o *neurotrasmettitore*, che può attivare o inibire l'elemento postsinaptico. In particolare, ai fini di questo lavoro di Tesi risulta di maggiore interesse descrivere questo tipo di meccanismo di trasmissione del segnale. Infatti, è a questo livello

che l'ACh gioca il suo ruolo fondamentale all'interno dei sistemi biologici. In questo tipo di sinapsi, la terminazione presinaptica che si avvicina al soma cellulare, assume una forma a fiasco schiacciato (*bottone*). Il bottone sinaptico contiene molti mitocondri e un elevato numero di vescicole sinaptiche, al cui interno è accumulato il neurotrasmettitore, nel nostro caso l'ACh. La trasmissione in una sinapsi chimica è stata particolarmente studiata nella giunzione tra nervo e muscolo, la **giunzione neuromuscolare**, che utilizza proprio l'ACh come neurotrasmettitore e per questo viene definita colinergica. La giunzione neuromuscolare è una sinapsi chimica tra un motoneurone spinale e una fibrocellula muscolare scheletrica. Quando l'assone del motoneurone entra in contatto con la membrana muscolare, si separa in numerose ramificazioni, alle cui estremità si formano delle espansioni (*bottoni sinaptici*). Questi bottoni poggiano su una regione specializzata della fibrocellula muscolare, la placca motrice, da cui sono separati da una fessura sinaptica di circa 100 nm. In corrispondenza dei bottoni presinaptici, la membrana postsinaptica della fibrocellula muscolare forma numerosi ripiegamenti, nella cui parte terminale è presente un'elevata densità di recettori per l'ACh. In sintesi, la successione degli eventi della trasmissione in una sinapsi chimica sono:

1. l'arrivo di un potenziale d'azione alla terminazione presinaptica che determina l'apertura dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, attraverso i quali gli ioni Ca^{2+} penetrano all'interno della terminazione;
2. l'aumento di ioni Ca^{2+} nella terminazione causa la liberazione per esocitosi del neurotrasmettitore dalle vescicole sinaptiche allo spazio sinaptico;
3. le molecole del neurotrasmettitore diffondono nello spazio sinaptico e si legano reversibilmente a specifici recettori presenti sulla superficie della membrana postsinaptica;
4. il legame del neurotrasmettitore al recettore aumenta la permeabilità della membrana postsinaptica agli ioni (per es. Na^+ , K^+ o Cl^-), la cui diffusione determina depolarizzazione o iperpolarizzazione;
5. nell'elemento postsinaptico si genera una variazione del potenziale locale, la cui ampiezza è proporzionale alla quantità di neurotrasmettitore liberato;
6. se il potenziale postsinaptico supera una certa ampiezza (il valore soglia di circa 15 mV), insorge nell'elemento postsinaptico un potenziale d'azione che si propaga a tutta la cellula.

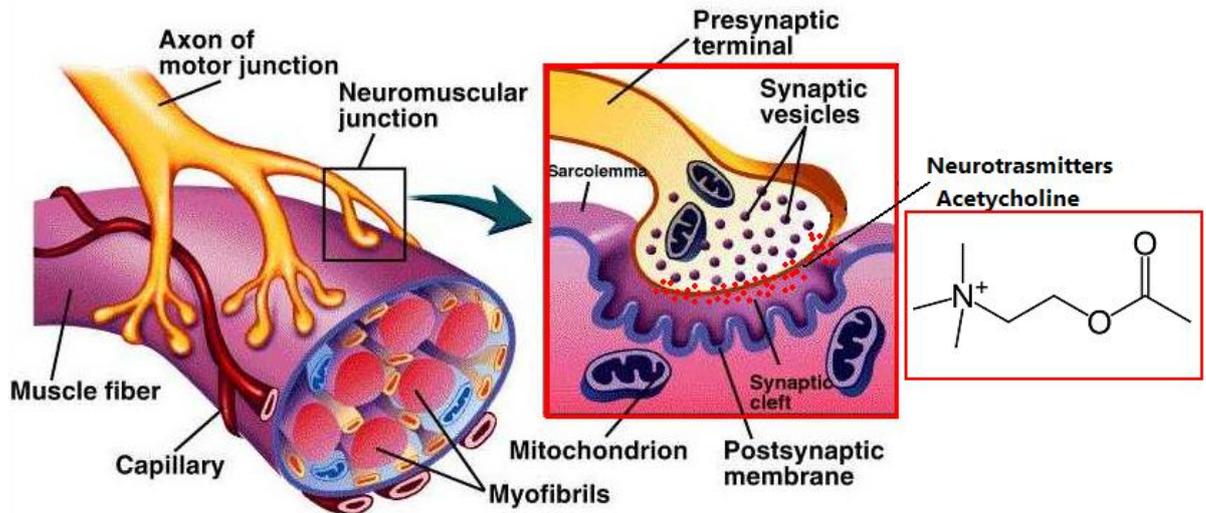


Figura 4.1 Rappresentazione della giunzione neuromuscolare e struttura chimica dell'acetilcolina (ACh).

Dalla sequenza proposta, appare chiaro che nella sinapsi chimica un ruolo fondamentale è svolto dal Ca^{2+} . L'aumento di questo ione all'interno della terminazione sembra avviare la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana presinaptica e propiziare l'esocitosi del neurotrasmettitore.

Relativamente ai neurotrasmettitori è importante sapere che in natura ne esistono molti (circa un centinaio). Essi vengono classificati in due gruppi: neurotrasmettitori a basso peso molecolare che mediano azioni rapide e neuropeptidi che modulano funzioni più lente e continue. Secondo il modello classico, una sostanza, per essere definita neurotrasmettitore deve possedere i seguenti requisiti:

1. essere presente nel neurone presinaptico;
2. essere liberata in risposta ad una depolarizzazione Ca^{2+} -dipendente;
3. sulla membrana postsinaptica devono essere presenti recettori specifici per la sostanza;
4. deve esistere un enzima chiave per la sua sintesi;
5. deve esistere un enzima che la degrada o un meccanismo che l'allontana.

L'acetilcolina è uno tra i neurotrasmettitori più frequenti in natura; viene sintetizzata nella terminazione sinaptica a partire dall'*acetilcoenzima A* e dalla *colina* in una reazione catalizzata dalla *colina acetiltransferasi (CAT)*. L'ACh può avere effetti anche molto diversi. A livello della giunzione neuromuscolare e altri distretti del sistema nervoso centrale produce un effetto eccitatorio, mentre nelle terminazioni postgangliari parasimpatiche esplica un effetto inibitorio. Questa differenza di azione dipende da

differenze nel recettore. Sono stati infatti caratterizzati due differenti tipi di recettori per l'ACh sulla base della struttura molecolare e della sensibilità farmacologica. Il recettore presente nella sinapsi neuromuscolare, oltre che dall'ACh viene attivato dalla nicotina (alcaloide del tabacco) e viene definito *nicotinico*, mentre il recettore presente nelle terminazioni parasimpatiche del sistema nervoso autonomo viene attivato dalla muscarina (veleno presente nell'*Amanita muscaria*) e quindi è definito *muscarinico*. Il recettore nicotinico per l'ACh è un canale che si apre in seguito al legame con il neurotrasmettitore, e consente il passaggio quasi contemporaneo sia di ioni Na^+ (in entrata) sia di ioni K^+ che determinano la depolarizzazione della membrana postsinaptica. Il legame invece con i recettori muscarinici innesca una cascata di reazioni il cui risultato finale è in genere l'apertura dei canali del K^+ o la chiusura dei canali del Ca^{2+} , con conseguente effetto inibitorio.

Questi concetti rivestono un ruolo particolarmente importante a livello del sistema nervoso centrale, dove le informazioni vengono trasmesse da neuroni ad altri neuroni. In questa sede infatti, sembra che la trasmissione sinaptica influenzi i meccanismi comportamentali, l'apprendimento e la memoria. Il processo attraverso il quale gli individui delle varie specie animali acquisiscono conoscenze relative al mondo circostante è l'*apprendimento*, e la facoltà di trattenere o custodire queste conoscenze è la *memoria*. Attualmente si ritiene che molti fenomeni legati all'apprendimento vengano finemente regolati a livello sinaptico. Gli esperimenti condotti su svariati animali hanno infatti dimostrato che l'attività sinaptica si può modificare nell'arco di periodi compresi tra alcuni millisecondi e vari mesi. I meccanismi cellulari alla base di questi cambiamenti sono costituiti da modificazioni transitorie dei processi di trasmissione sinaptica, mentre le modificazioni più durature coinvolgono l'espressione genica. I parametri di ciascuna tappa della trasmissione sinaptica possono modificarsi nel tempo. Sul versante presinaptico i tassi di sintesi, accumulo e liberazione dei neurotrasmettitori possono essere diversi; sul versante postsinaptico la sensibilità al neurotrasmettitore può aumentare o diminuire secondo le circostanze. I cambiamenti dei parametri della trasmissione sinaptica sono importanti sia per la regolazione omeostatica del metabolismo dei neurotrasmettitori, sia per la plasticità sinaptica: cioè il cambiamento nel tempo dell'efficienza sinaptica. Molti ritengono che questa sia alla base delle variazioni nel tempo della funzionalità nervosa. Per questo motivo, la base sinaptica dello sviluppo del sistema nervoso, il metabolismo dell'acetilcolina, nonché l'attività e l'espressione degli enzimi deputati alla sua sintesi e degradazione, sono motivo di indagine per lo studio di meccanismi funzionali come

l'apprendimento e la memoria; ogni variazione di questi parametri potrebbe influenzare tali comportamenti.

4.2 L'ACETILCOLINESTERASI

4.2.1 Struttura Molecolare e Meccanismo di Funzionamento

Nelle sinapsi colinergiche l'enzima *acetilcolinesterasi* (AChE) gioca un ruolo importantissimo nella terminazione della trasmissione sinaptica, idrolizzando l'acetilcolina (ACh) nella fessura sinaptica dopo che questo neurotrasmettitore viene rilasciato dal terminale nervoso presinaptico. L'AChE è un marker specifico per le sinapsi colinergiche sia nel sistema nervoso centrale (SNC) che in quello periferico, includendo anche la giunzione neuromuscolare (Schweitzer, 1993). Le origini e le dinamiche della produzione di AChE a livello sinaptico sono di grande interesse e sebbene molti lavori si sono focalizzati sul fatto che questo enzima venga prodotto a livello postsinaptico dalle cellule muscolari (Bursztajn et al. 1991; Rossi and Rotundo, 1992), ci sono alcune evidenze che anche neuroni presinaptici potrebbero produrre questo enzima (Chubb and Smith, 1975).

L'AChE è una molecola biologica di tipo proteico ad azione catalizzatrice, che si occupa di promuovere reazioni chimiche aumentandone la velocità di reazione e favorendo così meccanismi molecolari che altresì sarebbero molto lenti. In relazione alla sua funzione biologica l'AChE rientra nella categoria degli enzimi **idrolasi**, e cioè quegli enzimi che si occupano di catalizzare delle reazioni di idrolisi. In particolare, l'AChE è una *serina idrolasi* appartenente alla famiglia delle *esterasi*, un gruppo di enzimi frequentemente presenti negli eucarioti superiori; questa famiglia di enzimi è molto variegata e solitamente esplica il suo ruolo funzionale su differenti tipi di esteri carbossilici (Patočka et al 2005).

Il monomero dell'AChE ha un peso molecolare variabile tra 60-80 kDa; strutturalmente è una molecola elissoidale di dimensioni approssimativamente di 45 x 60 x 65 Å, caratterizzata da 12 β-foglietti centrali circondati da 14 α-eliche (Sussman et al. 1991).

Come ogni enzima, una delle caratteristiche più importanti dell'AChE è rappresentata dalla struttura e funzionalità del *sito attivo*, ossia quella parte della molecola cataliticamente attiva che è sede della reazione enzimatica con il substrato.

Da quando, nel 1991, fu identificata la struttura cristallina dell'AChE in *Torpedo californica*, molti scienziati iniziarono a studiare le modalità di azione di questa idrolasi estremamente efficiente, cercando di relazionare la sua funzione alle sue caratteristiche

strutturali (Sussman et al. 1991). Quello che è emerso dai vari studi è che ciò che rende l'AChE un enzima così efficiente è proprio la conformazione del suo sito attivo. Quest'ultimo infatti è situato alla base di una stretta e profonda cavità all'interno della struttura molecolare dell'enzima (Silman and Sussman, 2005); questa cavità, profonda circa 20 Å, è comunemente definita “*active-site gorge*” o “*aromatic-gorge*”, e cioè gola del sito attivo o gola aromatica, per il fatto che è caratterizzata dalla presenza di 14 residui aromatici altamente conservati (Silman and Sussman, 2005; Harel et al. 1993). All'interno del sito attivo sono presenti altre sub-zone, la prima situata all'ingresso del sito, denominata “*peripheral anionic site*” (*PAS*), e caratterizzata principalmente dalla presenza del *Trp279*, con il quale il gruppo quaternario dell'ACh interagisce nella fase di entrata nel sito attivo; la seconda è il cosiddetto “*catalytic anionic site*” (*CAS*), nel quale l'elemento di interazione con l'ACh è principalmente il *Trp84*. Sull'altra estremità del sito attivo la maggior parte dell'ACh viene confinata in quello che comunemente viene definito “*acyl pocket*”, ossia un distretto del sito attivo dove gli elementi predominanti sono due residui di *Phe288* e *Phe290*. L'idrolisi vera e propria viene realizzata alla base della gola catalitica dove è situato il vero macchinario catalitico, e cioè la “*triade catalitica (catalytic triad)*”, costituita da *Glu327-His440-Ser200*, che rappresentano gli elementi per mezzo dei quali si realizza l'interazione definitiva con il substrato. E' proprio qui che l'ACh viene idrolizzata a *colina* ed *acetato*. La colina verrà in seguito recuperata nei distretti presinaptici, dove la colina acetiltransferasi catalizzerà il processo inverso di sintesi dell'ACh. In figura 4.2 viene riportata una rappresentazione della struttura molecolare dell'AChE e un dettaglio della posizione e conformazione del sito attivo:

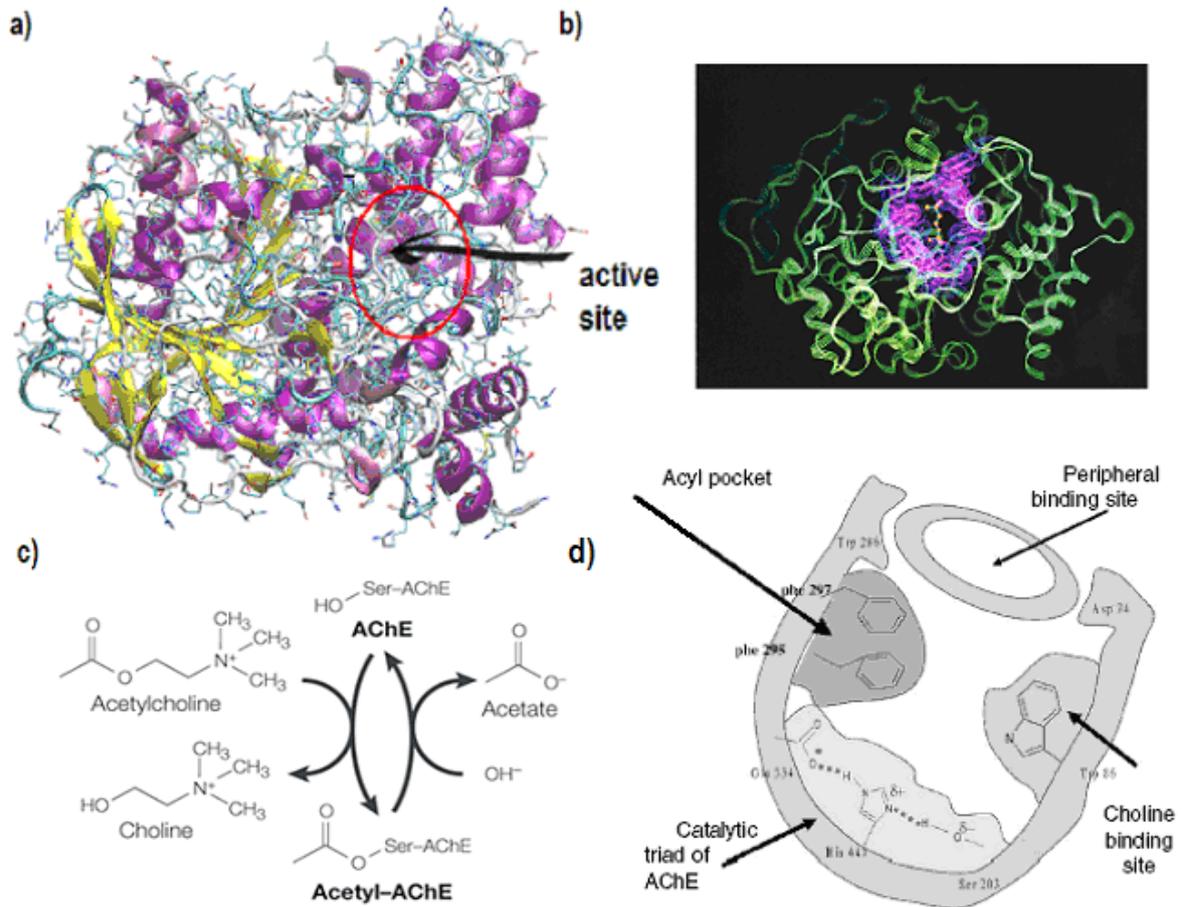


Figura 4.2 Rappresentazione della struttura molecolare dell'AChE (a); posizione del sito attivo all'interno dell'enzima (b); schema della reazione di idrolisi enzimatica (c); dettaglio della conformazione del sito attivo (d).

Il fatto che il sito attivo dell'AChE sia collocato così all'interno della struttura molecolare ha sempre destato molta curiosità nel mondo scientifico. Tuttavia, sembra che proprio questa particolare conformazione conferisca all'AChE la capacità di interagire nel migliore dei modi con il substrato. Infatti, in queste condizioni, l'ACh viene completamente circondata dall'enzima permettendo interazioni multiple substrato/enzima (Silman e Sussman, 2008). Questa reazione pone nuovamente in circolo la colina e l'acetato che verranno così recuperati e utilizzati per la sintesi di nuove molecole di acetilcolina. Il processo di recupero della colina è descritto in figura 4.3:

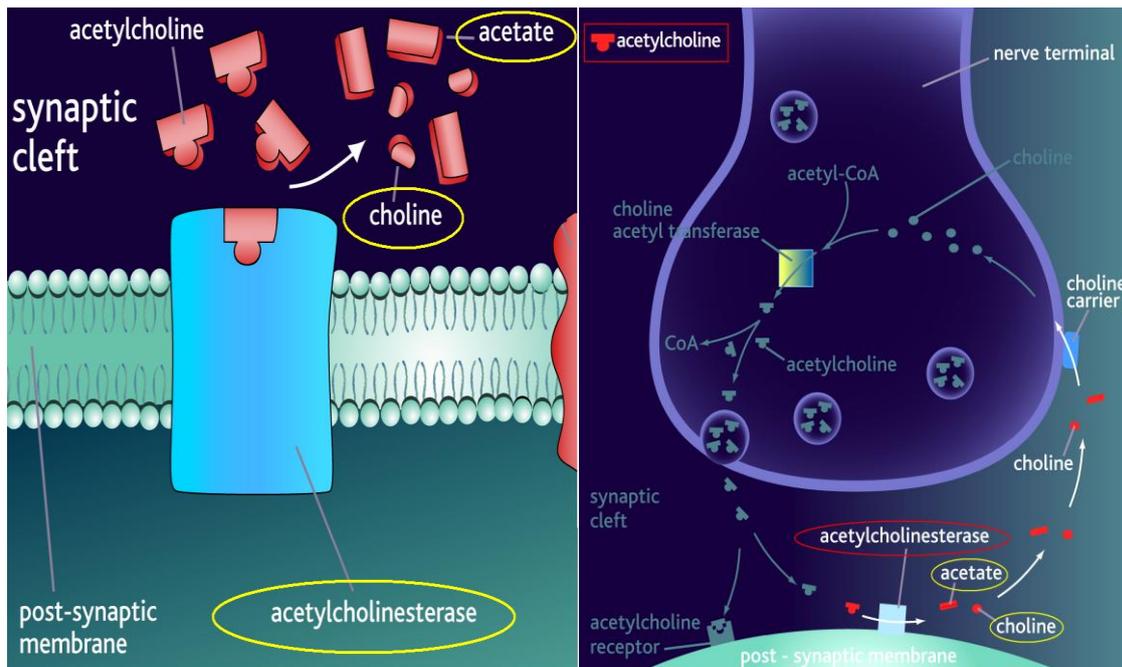


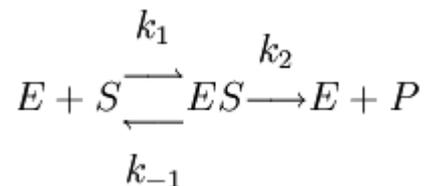
Figura 4.3 Rappresentazione dell'interazione ACh – AChE e successivo recupero della colina e dell'acetato.

Ai fini della comprensione del meccanismo di funzionamento dell'AChE rivestono un ruolo fondamentale le caratteristiche elettrostatiche dell'enzima. L'AChE infatti, possiede un *momento di dipolo* molto grande orientato approssimativamente lungo l'asse del sito attivo. Si ritiene che tale momento di dipolo possa servire ad attrarre il substrato carico positivamente all'interno del sito attivo (Silman e Sussaman, 2008). Shafferman et al. hanno proposto che a contribuire in maniera incisiva alla formazione di questo dipolo siano una serie di residui acidi posizionati all'ingresso della gola aromatica (Shafferman et al. 1994). Quindi, l'interazione tra AChE e ACh è favorita sia dalle caratteristiche strutturali del sito attivo, che dalla presenza di forze elettrostatiche di attrazione che coinvolgono la carica positiva presente sul substrato.

4.2.2 Cinetica Enzimatica

L'acetilcolinesterasi promuove processi di catalisi enzimatica in cui la velocità della reazione dipende esclusivamente dalla quantità di substrato. Tale reazione si sviluppa con una cinetica che va a *saturatione* quando il sito attivo è completamente occupato dal substrato, per cui, anche al crescere della concentrazione di substrato la velocità di reazione non aumenta oltre un certo limite.

Una reazione enzimatica solitamente è caratterizzata da uno step intermedio in cui si genera un intermedio di reazione enzima/substrato, e solo in seguito evolve verso la formazione dei prodotti. Alla fine del processo l'enzima risulta intatto e non viene incluso all'interno dei prodotti di reazione. Tipicamente, una reazione enzimatica viene descritta schematicamente come riportato di seguito:



E = enzima; S = substrato; ES = complesso enzima/substrato; P = prodotti di reazione; K_1 , K_{-1} , K_2 = costanti di reazione.

Questo tipo di reazione ha una cinetica che viene descritta dalla nota equazione di Michaelis-Menten, secondo la quale la *velocità di reazione* è uguale a:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{con} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Il modello cinetico spiega come all'aumentare anche di poco della concentrazione del substrato disponibile all'enzima (di concentrazione supposta costante), la velocità della reazione aumenti vertiginosamente 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 semplicemente perché è presente tanto substrato da saturare tutto l'enzima presente in soluzione, perciò un'ulteriore aggiunta di substrato non servirebbe in quanto non verrebbe più attaccato da enzimi. La K_m viene indicata come la concentrazione di substrato necessaria affinché la reazione abbia velocità pari a metà della velocità massima; esprime l'affinità dell'enzima per il substrato, maggiore è il valore di K_m minore

è l'affinità e viceversa. La cinetica a saturazione tipica di questi processi può essere descritta in un grafico velocità/concentrazione di substrato e viene rappresentata formalmente da una funzione a forma di iperbole (fig 4.4).

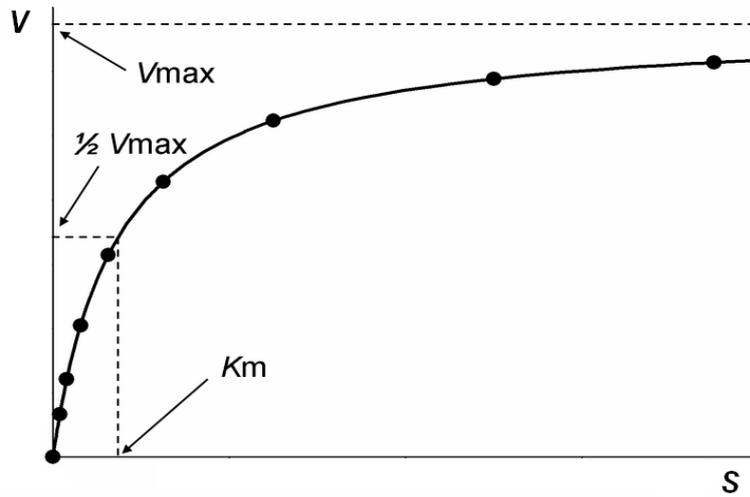
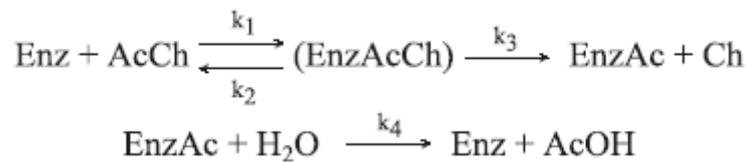


Figura 4.4 Andamento della velocità di reazione enzimatica in funzione della concentrazione di substrato.

La cinetica dell'acetilcolinesterasi segue esattamente le regole appena definite e lo schema generale della reazione enzimatica può essere riassunto come segue:



La velocità di reazione viene valutata in questo modello come tasso di produzione del prodotto colina in relazione al tempo e l'equazione che la descrive assume la forma dell'equazione di Michaelis-Menten:

$$v = \frac{d[\text{Ch}]}{dt} = \frac{k_3[\text{Enz}]_0[\text{AcCh}]_0}{[\text{AcCh}]_0 + K_M} = \frac{V_M[\text{AcCh}]_0}{[\text{AcCh}]_0 + K_M}$$

$$\text{con } V_M = k_3[\text{Enz}]_0; \quad K_M = \frac{k_4(k_2 + k_3)}{k_1(k_3 + k_4)};$$

4.2.3 Polimorfismi dell'Acetilcolinesterasi

Analisi biochimiche dell'AChE da organi elettrici dei pesci e da altri tessuti hanno permesso la caratterizzazione di diverse forme molecolari dell'enzima. I polimorfismi dell'AChE derivano principalmente dallo *splicing alternativo* a livello genico sull'estremità 3' del trascritto, il quale, genera diverse varianti di AChE che differiscono nelle loro modificazioni post-traslazionali e nelle proprietà di oligomerizzazione (Massoulié et al 2008). Nei mammiferi infatti l'AChE è codificata da un singolo gene, il quale sembra possedere molti siti di inizio trascrizione, con pattern alternativi di splicing subito prima dell'esone di codifica; ciò permette una scelta alternativa del sito accettore di splicing nella regione 3' del trascritto (Li et al 1993; Atanasova et al 1999). Questo genera proteine che hanno lo stesso dominio catalitico di circa 500 aminoacidi, ma differiscono per un piccolo peptide con meno di 50 residui, denominato *peptide C-terminale*. In dipendenza della diversa scelta del sito accettore di splicing, seguente l'esone costitutivo che codifica la parte C-terminale del comune dominio catalitico, una parte più o meno estesa di pre-mRNA può essere rimossa per posizionare diverse sequenze che determinano peptidi C-terminali diversi (Massoulié et al 2008). Normalmente questi processi danno luogo a tre forme di trascritti: nell'AChE di mammifero, l'assenza di splicing nella regione 3' genera il *trascritto R* (“*readthrough*” *transcript*), il primo sito accettore genera il *trascritto H* (“*hydrophobic*” *transcript*), e il sito accettore posizionato a valle genera il *trascritto T* (“*tailed*” *transcript*) (Li et al 1991).

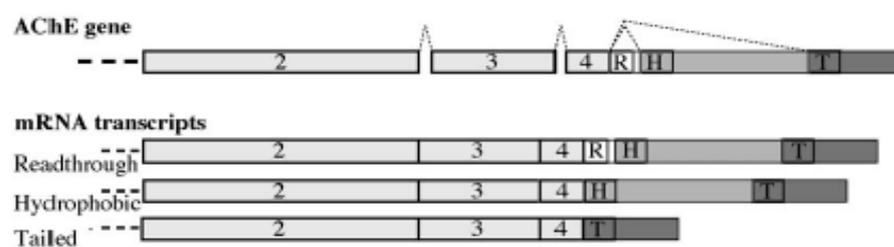


Figura 4.5 Rappresentazione schematica del gene dell'AChE e relativi trascritti classificati per tipo di splicing.

Il trascritto R è stato caratterizzato in *Torpedo californica* e nei mammiferi. Questo trascritto si genera per mancanza di splicing nella regione 3' del gene e di solito è presente solo in piccole quantità; esiste in linee cellulari trasformate ed in tessuti embrionali, 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). Comunque la presenza

di questa forma in vivo è molto bassa, **meno del 2% dell'AChE totale** attiva nel cervello, perciò si presume che il contributo alla regolazione colinergica attraverso l'idrolisi dell'ACh nel sistema nervoso sia molto scarso (Perrier et al 2005).

Il trascritto H codifica per l'AChE_H, una forma molecolare che esiste negli insetti, nei nematodi, negli anfibi protocordati e in alcuni vertebrati come in Torpedo e nei mammiferi. Il trascritto H esprime un peptide C-terminale chiamato *h* ("hydrophobic") caratterizzato dalla presenza di una regione per l'introduzione di *glicofosfatidilinositolo* (*GPI-addition*), attraverso il quale una forma dimerica dell'enzima si ancora alla membrana. In Torpedo queste forme molecolari ancorate attraverso GPI esistono nel cervello e negli organi elettrici, mentre nei mammiferi sono espresse principalmente sulla superficie degli eritrociti. Questo enzima legato alla membrana sembra avere molti ruoli soprattutto nella regolazione della permeabilità di membrana (Massoulié et al 2005). Inoltre, in accordo con alcuni studiosi la presenza di questa forma sulla superficie degli eritrociti, gioca un ruolo fondamentale nell'idrolisi di qualsiasi molecola di Ach che diffonde all'interno del flusso sanguigno (Silver, 1974).

Il trascritto T ("tailed") è presente in tutti i vertebrati, e al contrario di H ed R sembra relazionato sia a vertebrati che invertebrati. L'AChE_T viene espressa in seguito allo splicing alternativo del gene codificante che da luogo alla formazione di un peptide *t* C-terminale di circa 41 residui aminoacidici, che permette alle subunità di AChE di formare omo-oligomeri, principalmente dimeri e tetrameri, associati alle membrane per mezzo di proteine di ancoraggio. Sono state caratterizzate due tipi di proteine di ancoraggio: il collagene ColQ (Krejci et al 1991 e 1997) e la proteina di transmembrana PRiMA (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-tailed forms*). Nel secondo caso, i tetrameri si congiungono al PRiMA (*Proline Rich Membrane Anchor*), una proteina di transmembrana ricca in proline per mezzo della quale l'AChE si ancora alla membrana. L'associazione tra le subunità catalitiche del'AChE e le proteine di ancoraggio ColQ e PRiMA prevede l'interazione tra il C-terminale e il PRAD (*proline-rich attachment domain*), ossia un dominio di ancoraggio ricco di proline, localizzato nelle regioni N-terminali delle proteine di ancoraggio (Bon et al 1997). Nelle forme legate alle code di collagene le cisteine di due *t* peptidi formano legami disolfuro con due cisteine localizzate vicino all'elemento ricco in proline del ColQ. Nelle forme associate al PRiMA, quattro cisteine poste sulle estremità maggiori del suo elemento ricco in proline, potrebbero legarsi a tutti e quattro i *t* peptidi,

sebbene è comunque riportato che il PRiMA è legato a solo due subunità dell'AChE_T nei complessi eteromerici isolati nel cervello (Massoulié et al 2005). Nei mammiferi la variante ancorata mediante la coda di collagene ColQ gioca un ruolo fondamentale a livello della giunzione neuromuscolare (Feng et al 1999), viceversa quella ancorata mediante PRiMA sembra essere la specie più presente a livello celebrale (Perrier et al 2003).

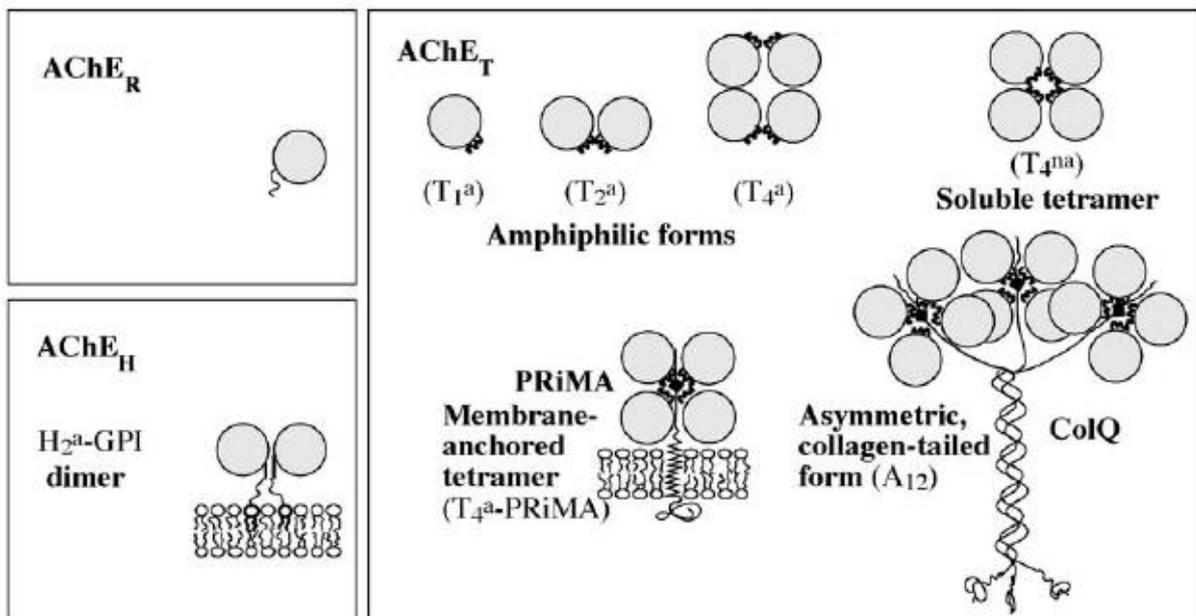


Figura 4.6 Rappresentazione schematica delle principali forme molecolari di AChE derivanti da splicing alternativo.

Tuttavia, come è stato riportato da Schweitzer, si ritiene che molecole di acetilcolinesterasi possano trovarsi anche segregate all'interno di compartimenti citoplasmatici come vescicole secretorie. La disponibilità dell'inibitore dell'AChE impermeabile alle membrane, *fosfolina*, ha permesso di effettuare dei test critici per validare questa possibilità (Inestrosa et al. 1981). Infatti, in seguito al trattamento di cellule intatte con una soluzione 1 μ M di fosfolina, è stato mostrato che né i livelli basali, né il rilascio stimolato di AChE veniva ridotto, a dimostrazione del fatto che l'AChE era associata a compartimenti che la proteggevano dalla fosfolina; questi compartimenti presumibilmente corrispondevano a vescicole secretorie localizzate nel citoplasma cellulare (Schweitzer, 1993).

4.2.4 Ruolo “non classico” dell’acetilcolinesterasi

Numerosi studi suggeriscono che l’AChE svolga altre funzioni oltre a quella di terminazione dell’impulso nervoso idrolizzando l’ACh nelle sinapsi colinergiche. Queste funzioni non classiche potrebbero prevedere per esempio l’idrolisi dell’ACh in contesti non sinaptici. E’ stato riportato che il residuo-26 del C-terminale del peptide ARP (acetylcholinesterase read-through peptide) prodotto quando viene indotta la variante R (AChE_R) possa modulare la differenziazione ematopoietica (Deutsch et al 2002).

Inoltre l’AChE mostra omologie strutturali con un gruppo di proteine di adesione neuronali, tra cui le neuroligine dei mammiferi e le glioactine e neuroactine di *Drosophila*. Questo suggerisce che uno dei ruoli non classici dell’AChE potrebbe essere quello di proteina di adesione nello sviluppo e mantenimento delle strutture sinaptiche (Scholl et al 2003). Molti gruppi hanno riscontrato evidenze nel ruolo dell’AChE nella crescita neuritica, mediata principalmente dal sito periferico dell’enzima, ma anche da forme cataliticamente inattive dello stesso (Layer et al 1993; Sternfeld et al 1998). Inestrosa et al. hanno mostrato che l’AChE, probabilmente attraverso il sito periferico, accelera l’assemblaggio dell’A β peptide nelle fibre amiloidi (Inestrosa et al 1996). Tuttavia, non si può dimenticare che ci sono molte evidenze riguardo alcuni disordini neuropatologici associati ad alterazioni caratteristiche dell’AChE. Esami effettuati su tessuti cerebrali di individui affetti da Alzheimer hanno mostrato una riduzione dell’attività dell’AChE nella neocorteccia temporale e nell’ippocampo (Perry et al. 1980). L’AChE potrebbe per questo essere intimamente coinvolta nelle patologie associate al morbo di Alzheimer.

4.2.5 *L'acetilcolinesterasi come possibile bersaglio dei campi elettromagnetici*

L'enzima è stato oggetto di numerosi studi come possibile bersaglio dei campi elettromagnetici, i primi dei quali risalgono agli anni ottanta. Come si riscontra in generale per tutta la letteratura riguardante i campi elettromagnetici, anche gli studi sulla acetilcolinesterasi risentono della variabilità dei modelli cellulari usati e delle tipologie di segnale a cui sono stati esposti. Questo ha reso molto difficile l'interpretazione generale dei risultati ottenuti. Tuttavia, come si evince dalla raccolta di dati riportati nella Tabella 10, è indubbio che l'attività dell'acetilcolinesterasi sia bersaglio degli effetti dei campi elettromagnetici:

Tabella 10. – Rappresentazione schematica di alcuni dati riportati in letteratura sugli effetti a carico di AChE.

TIPOLOGIA DI CEM	MODELLO CELLULARE	ATTIVITA' AChE	AUTORE
Pulsed EMF 80 kA/m	Cellule cardiache di ratto bianco	Aumentata	Abramov 1980
Microwave radiation 2.45 GHz SAR (1-100 mW/g)	Enzima AChE purificato	Invariata	Galvin 1981
RF 147 MHz AM 16 Hz	Cellule di neuroblastoma	Aumentata	Dutta 1991
EMF 60 Hz	Embrioni di pollo	Ridotta	Moses 1992
SMF 1.4 Tesla	Cellule di midollo osseo murino	Ridotta	Stagemann 1992
RF 147 MHz AM 16 e 76 Hz	Cellule cerebrali di ratto	Ridotta	Kunjilwar 1993
X-Rays	Eritrociti	Ridotta	Krokosz 2005
Microwave radiation 2.45 GHz	Eritrociti	Aumentata	Vukova 2005
ELF-MF 75 Hz	Eritrociti e Sinaptosomi	Ridotta	Morelli 2005
ELF-MF 50 Hz	Sinaptosomi	Ridotta	Calzia 2010

Dalla tabella 10 si nota come gli studi di laboratorio per la valutazione delle possibili variazioni nell'attività dell'AChE, dovute ad esposizione a campi elettromagnetici, siano svolti sui più svariati tipi cellulari e testando campi di diversa natura. I risultati presenti in letteratura sono di diverso tipo in relazione alle variabili contenute nei diversi esperimenti. Tuttavia, anche se non si riesce ancora a determinare quale sia il principale effetto dei campi sull'AChE non vi è dubbio della presenza di interazioni che modifichino in qualche modo l'attività dell'enzima.

4.3 LA LINEA CELLULARE PC12

L'attività di studio degli effetti biologici dei campi elettromagnetici ad alta frequenza svolta per questo lavoro di Tesi è stata pianificata sull'analisi dei possibili effetti dei CEM su cellule in coltura. Il sistema biologico scelto per questo studio sono state le cellule PC12. Tale linea cellulare è costituita da cellule tumorali derivanti dal *feocromocitoma* di ratto, un tumore che si sviluppa dalle cellule cromaffini, situate principalmente nella midollare del surrene (Greene e Tischler 1976). I primi studi sullo sviluppo di questa linea cellulare sono stati fatti intorno agli anni '70, dall'interesse per i meccanismi che regolano la differenziazione nei tumori umani derivati da cellule che producono ormoni amminici e peptidici, associate alla serie delle *cellule APUD di Pearse (Amine Precursor Uptake and Decarboxilation)*. Tra questi tumori c'era il feocromocitoma e la rispettiva controparte invariata, cioè le cellule cromaffini. Questi studi culminarono con la derivazione di una singola linea cellulare clonata di feocromocitoma di ratto a cui fu dato il nome di PC12. Il feocromocitoma è un tumore secernente *catecolammine*, infatti le PC12 hanno la capacità di sintetizzare, immagazzinare e secernere alte quantità di catecolammine, soprattutto dopamina (DA) e norepinefrina (NE), ormoni rilasciati di solito dalle ghiandole surrenali in condizioni di stress o cali di zuccheri. La dopamina è un neurotrasmettitore del sistema nervoso centrale (SNC), mentre la norepinefrina è un neurotrasmettitore del sistema nervoso periferico; entrambe causano cambiamenti fisiologici generali che preparano il corpo ad una attività fisica e producono una reazione generale del SNC.

Da un punto di vista strutturale le cellule PC12 hanno i caratteri morfologici delle cellule cromaffini in vari stadi di maturazione (Greene e Tischler 1976), sono di dimensioni relativamente piccole che variano tra i 5-10 μm , contengono una quantità

limitata di citoplasma e hanno un tempo di moltiplicazione lungo, superiore ai due giorni (Spratt 1998).

Tra le proprietà più importanti delle PC12 vi è la capacità di rispondere all'*NGF* (*Nerve Growth Factor*, fattore di crescita nervoso), una proteina che influenza profondamente la crescita e lo sviluppo di neuroni. L'effetto dell'*NGF* sulle PC12 è quello di influenzare l'acquisizione dei tipici caratteri delle cellule neuronali. L'*NGF* provoca la stimolazione della crescita di neuriti, l'aumento della dimensione delle cellule e l'induzione di alcuni enzimi che interessano la sintesi dei neurotrasmettitori. Inoltre il trattamento con *NGF* sembra limitare la capacità delle PC12 di replicarsi, infatti il processo di mitosi cessa in seguito all'azione dello stesso (Greene e Tischler 1976). Tuttavia in assenza di *NGF* ma in presenza di siero le PC12 mantengono le loro proprietà di proliferazione (D'Ambrosi et al 2004).

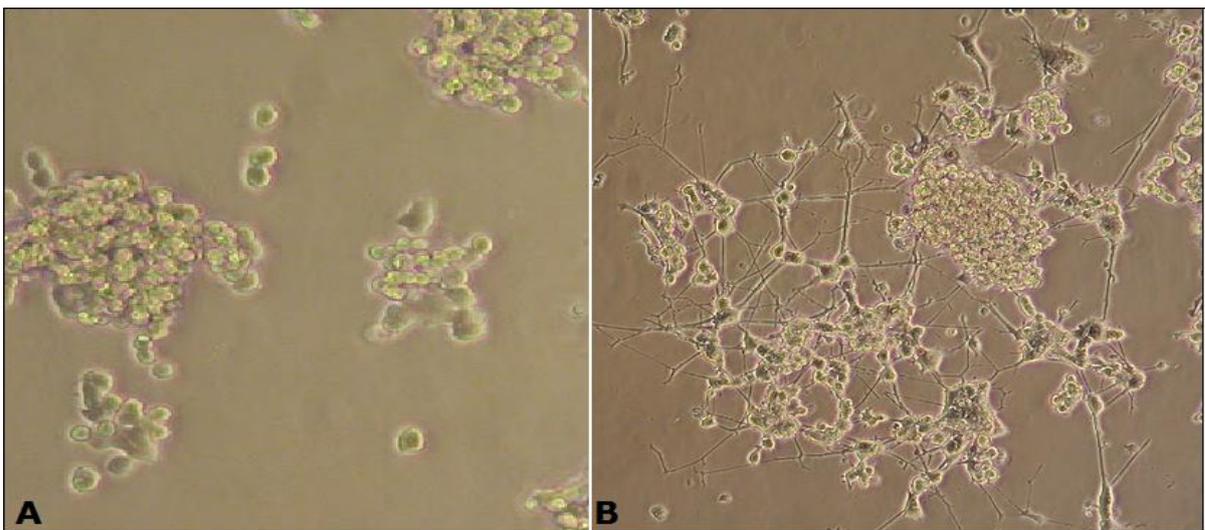


Figura 4.7 Immagine al microscopio ottico di cellule PC12 in assenza (a) e presenza (b) di *NGF*.

Precedentemente ai trattamenti con *NGF* le PC12 sembrano non essere in grado di fornire risposte elettriche attive. Con l'aumento dell'esposizione all'*NGF* si sviluppa un aumento della proporzione di cellule che mostrano risposte attive. Dopo due settimane di trattamento quasi tutte le cellule sono eccitabili e possono generare potenziali di azione. Le PC12 per di più hanno recettori specifici per il fattore di crescita epidermico *EGF* (*epidermal growth factor*). A questo proposito è di particolare interesse la dimostrazione del fatto che l'interazione dell'*NGF* con le PC12 causi la diminuzione del legame e delle risposte nei confronti dell'*EGF* (Greene e Tischler 1976).

Inoltre, le PC12 sono in grado di sintetizzare e immagazzinare l'*acetilcolina* (*ACh*); molte proprietà della sintesi e accumulo di *ACh* nelle PC12 sembrano simili a quelle

esibite dai neuroni colinergici. Le PC12 infatti prelevano la *colina* dal mezzo extracellulare, ed in queste cellule come nei neuroni derivanti dal cervello di mammifero, la colina accumulata serve da importante precursore per la sintesi di ACh (Melega et al 1981). Non solo, le PC12 hanno mostrato la capacità di secernere sia l'ACh che l'enzima deputato alla sua degradazione e cioè l'*acetilcolinesterasi (AChE)*.

In particolare, come è stato riportato da alcuni studi le cellule PC12 esprimono principalmente l'AChE_T, una forma legata al doppio strato fosfolipidico attraverso una proteina di transmembrana ricca in proline (PRiMA) (Choi et al. 2008).

L'AChE, assieme alla colina acetiltransferasi (CAT) e all'acido γ -aminobutirrico (GABA) sono tra i principali *marker biochimici* per studi di natura neurobiologica sulle cellule PC12, le quali hanno ormai permesso di superare i problemi tecnici inerenti ai sistemi sperimentali comunemente utilizzati per questo tipo di studi (Melega et al 1981). La linea cellulare PC12 è diventata un ottimo modello per lo studio dei meccanismi di azione dell'NGF, data la loro capacità di rispondere a questo fattore di crescita. Inoltre, vista la possibilità di immagazzinare e secernere ACh e AChE esse risultano un buon modello anche per lo studio del metabolismo e funzionamento di queste, e quindi contribuire alla delucidazione di alcuni meccanismi molecolari insiti in disagi cerebrali come il *morbo di Alzheimer*.

5. MATERIALI E METODI SPERIMENTALI

5.1 COLTURE CELLULARI

Le colture cellulari vengono utilizzate nella ricerca come modello sperimentale in innumerevoli tipi di esperimenti. Esse sono utilizzate per analizzare l'effetto di farmaci e verificare la mutagenicità e cancerogenicità delle sostanze. Vengono utilizzate come modello in cui studiare effetto dell'espressione di particolari geni. Le cellule mantenute in coltura hanno bisogno costantemente di un insieme di sostanze quali sali minerali, amminoacidi, glucosio e vitamine, che contribuiscono alla loro sopravvivenza. Per le cellule PC12 il mezzo di coltura utilizzato è stato il D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), ad alto contenuto di glucosio, arricchito con 10% di siero di cavallo, 5% di siero fetale bovino e 1% di una miscela di antibiotici (penicillina-streptomicina)

I componenti del mezzo prima di essere miscelati tra loro vengono scaldati mediante bagnomaria alla temperatura di 37 °C. Le cellule sono così mantenute in un incubatore (THERMO electron corporation) che mantiene le condizioni ambientali costanti a 37°C, 5% di CO₂, 95% di umidità. Quando al D-MEM vengono aggiunti i sieri e gli antibiotici, si parla di *mezzo completo*, ed è quello che si usa per mantenere in linea le cellule, favorendo la loro crescita. Quando al D-MEM non vengono aggiunti sieri e antibiotici, si parla di *mezzo base*, che è quello in cui vengono messe le cellule durante gli esperimenti.

L'allestimento ed il mantenimento della linea cellulare prevedono una serie di operazioni che verranno di seguito descritte. Ogni operazione viene svolta rigorosamente sotto cappa biologica a flusso laminare in condizioni di sterilità. La cappa utilizzata è del tipo Steril VBH MP/99 ed è classificata biologicamente di classe 2, il che significa che è un apparecchio a circolazione parziale di aria, adatto a lavorare con agenti a basso-medio potenziale di rischio biologico, in assenza di composti tossici, volatili o radionuclidi. Le principali azioni per il mantenimento della linea cellulare sono:

- congelamento delle cellule;
- scongelamento delle cellule;
- mantenimento delle cellule;
- semina delle cellule.



Figura 5.1 Semina di una linea cellulare e dettaglio di piastre petri per colture cellulari.

5.1.1 Congelamento delle cellule

La fase di congelamento delle cellule è molto delicata, una volta eseguita, le cellule non si devono scongelare prima di un mese e possono essere conservate a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ per non oltre 6 mesi. La prima operazione da svolgere è la preparazione del mezzo completo fresco. Si esegue quindi un lavaggio della piastra contenente il mezzo le cellule in coltura con 2 mL di PBS (soluzione tampone contenente KCl 2,67 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 137,93 mM, NaHPO_4 8,06 mM) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, dopo aver tolto il mezzo vecchio e si aggiungono 5 mL di mezzo completo fresco. A questo punto utilizzando una pasteur sterile si spipetta e si raschia delicatamente sul fondo per staccare le cellule, dopodichè si trasferiscono in una falcon da 15 mL. Si prepara il mezzo di congelamento: mezzo completo più DMSO al 20% e si tiene in ghiaccio. Si prendono le cellule necessarie per la *semina della linea* prima di congelare tutto, si preparano i criovials per il congelamento e vi si aliquotano le cellule al loro interno nella misura di 800 μL . Si aggiungono altri 800 μL di soluzione di congelamento goccia a goccia, si chiudono i criovials con parafilm, si avvolgono in cotone idrofilo e polistirolo ed infine si mettono a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un ora, quindi a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 48 ore, poi a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.2 Scongellamento delle cellule

Lo scongelamento delle cellule deve avvenire nel più breve tempo possibile. La prima operazione da svolgere è la preparazione del mezzo completo fresco; in seguito l'aliquota di cellule (congelate a -80°C) viene posta a scongelare in un bagnomaria a 37°C per non oltre 5 minuti. Trascorso questo tempo essa viene trasferita in una falcon da 50 mL sterile, a cui vengono aggiunti goccia a goccia 10 mL di mezzo completo agitando delicatamente; in seguito si aggiungono altri 10 mL dello stesso più velocemente. A questo punto la falcon viene centrifugata per 5 minuti a temperatura ambiente a $200 \times g$ e una volta che il pellet di cellule è precipitato si elimina il surnatante e si aggiungono 5 mL di mezzo completo sul pellet spipettando con cura per risospendere le cellule.

5.1.3 Mantenimento in linea delle cellule

Le cellule PC12 vengono fatte crescere in adesione ad un supporto all'interno di apposite piastre di coltura. Poco prima che le cellule arrivino a "confluenza", cioè formino un monostrato che ricopre interamente la superficie di adesione, limitando lo spazio che hanno per crescere, è necessario staccarle dal fondo attraverso un'operazione di tripsinizzazione. Questa viene effettuata mediante *tripsina*, un enzima litico in grado di degradare le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti, rompendo i legami tra le singole cellule e quelli che si formano tra la cellula e la parete trattata della fiasca. Questo serve per poter diluire le cellule e rinnovare le condizioni per il loro mantenimento e la loro crescita. Prima di iniziare questa fase si mettono a scaldare il mezzo completo, il PBS e la tripsina a 37°C . Si elimina il mezzo di coltura dalle cellule, si esegue un lavaggio della piastra con 2 mL di PBS, si agita delicatamente e in seguito si elimina nuovamente il PBS appena messo. Quindi si aggiungono 200 μL di Tripsina/EDTA 10 x distribuendo goccia a goccia sulla superficie della piastra, si agita con delicatezza e si mette in incubatore non oltre 5 minuti a 37°C . La reazione di tripsinizzazione non deve durare più del tempo stabilito al fine di evitare danni alle singole cellule; trascorso questo tempo è possibile vedere le cellule staccate dalla loro superficie di adesione. In seguito, vengono aggiunti 2 mL di mezzo completo per inibire l'azione della tripsina, si risospende bene e si recupera in una falcon sterile. Per recuperare tutte le cellule possibili si effettua un altro lavaggio con 2 mL di PBS e si svuota nella stessa falcon. Quest'ultima viene centrifugata a $400 \times g$ a temperatura ambiente per 5 minuti. Si elimina quindi il surnatante e si risospende

il pellet in 5 mL di mezzo completo spipettando bene per disgregare il pellet e risospendere bene le cellule. Infine si prendono due nuove piastre nelle quali si mettono 10 mL di mezzo completo e vi si aggiunge l'opportuna quantità di sospensione cellulare in relazione a quando servono pronte.

5.1.4 Semina delle cellule per gli esperimenti

La semina delle cellule consiste nel porre un'adeguata quantità di sospensione cellulare, ottenuta preventivamente dalla tripsinizzazione e dalla successiva diluizione in mezzo completo, nel supporto che si intende utilizzare per eseguire i trattamenti sperimentali (piastre Petri $\Phi = 35$ mm o piastre a 6 pozzetti) assieme ad un'opportuna quantità di mezzo completo. Le operazioni da svolgere sono identiche a quelle già riportate per la fase di mantenimento in linea delle cellule; dopo aver centrifugato e risospeso il pellet in 5 mL di mezzo completo, si fa il calcolo di quanto volume di sospensione cellulare bisogna utilizzare per ogni pozzetto, si prepara una 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 ciascuna petri. Infine si aggiunge 1 mL di mezzo completo a ogni piastra, e le cellule così preparate sono pronte per crescere in attesa di essere esposte ai trattamenti sperimentali.

5.2 IL SISTEMA DI ESPOSIZIONE AI CAMPI ELETTROMAGNETICI

In laboratorio i campi elettromagnetici vengono prodotti mediante un sistema di esposizione realizzato dalla IT'IS-Foundation (Foundation for Information Technologies in Society, ETH, Zurigo, Svizzera) in grado di simulare il funzionamento di un telefono GSM.

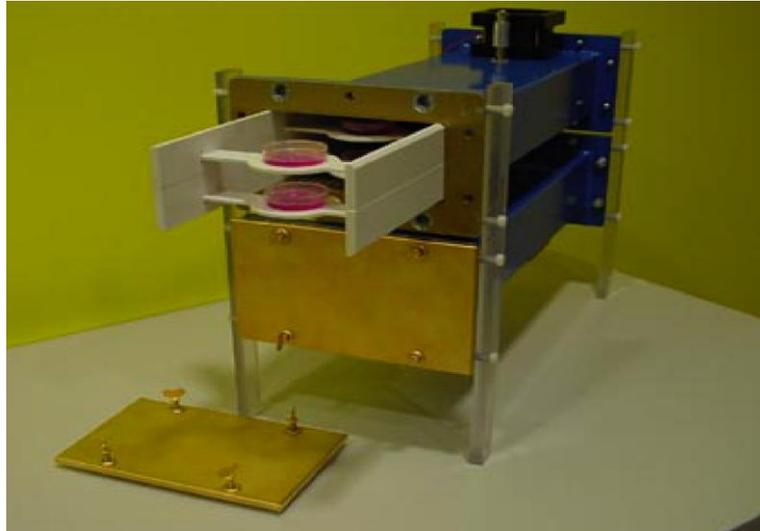


Figura 5.2 Sistema di esposizione ai campi elettromagnetici; si notano le piastre petri con le cellule da esporre.

La struttura dell'irraggiatore è costituita da diverse parti:

- **due guide d'onda** (*waveguide*) di dimensioni $128,5 \times 65 \times 424 \text{ mm}^3$ in materiale metallico, placcate d'oro sulla superficie interna, in quanto essendo un ottimo conduttore, l'oro facilita lo spostamento delle cariche all'interno delle guide d'onda. Queste sono inserite entro un incubatore e comunicano con l'esterno attraverso una ventola il cui scopo è quello di favorire un flusso di aria che consenta gli scambi di calore, ossigeno ed anidride carbonica;
- **un'antenna**, all'interno di ogni guida d'onda, il cui scopo è quello di emettere le onde elettromagnetiche;
- **una sonda** all'interno di ogni guida che rileva l'intensità dei campi elettromagnetici permettendo al computer di trovare la frequenza esatta che metta in risonanza la guida.
- **una sonda** all'interno di ogni guida per il rilevamento della temperatura all'interno della guida stessa, posizionata nel condotto di aerazione, e che mette in contatto la guida con l'ambiente esterno.

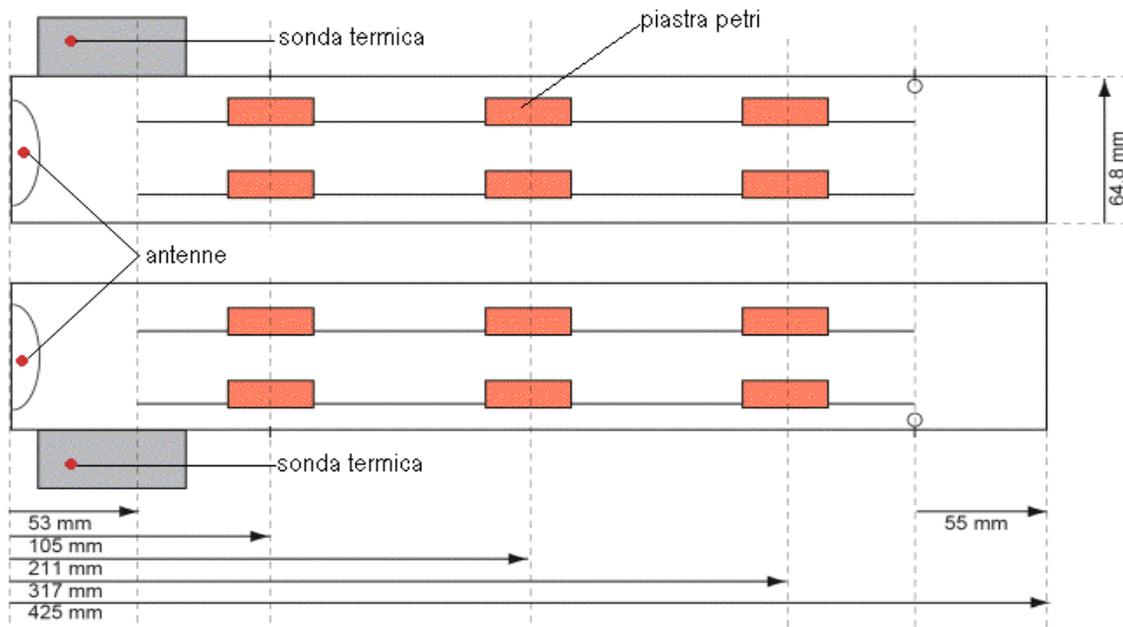


Figura 5.3 Schema rappresentativo della struttura delle guide d'onda.

La sorgente di onde elettromagnetiche all'interno delle guide d'onda è l'antenna. Ad essa viene applicata, mediante un generatore, una differenza di potenziale con frequenza (ω) pari a circa 1.8 GHz, in grado di spostare le cariche presenti su di essa, creando così un *momento di dipolo* che varia nel tempo secondo la relazione:

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

Questo dipolo presenta un massimo di segno positivo ad un tempo $t = 0$, diventa 0 per t che rende vera l'equazione $\omega t = \pi/2$, diventa un minimo di segno negativo per t che rende vera l'equazione $\omega t = \pi$, quindi ritorna ad essere 0 quando $\omega t = 3/2\pi$, ed in seguito massimo positivo completando il ciclo. 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 dato che:

$$\frac{1}{1,8 \cdot 10^9 \text{ GHz}} = 5,46 \cdot 10^{-10} \text{ s}$$

Ognuna delle due guide d'onda è fornita di un supporto in plastica in cui vengono posizionate piastre Petri di diametro di 35 mm sistemate in due file una sull'altra. All'interno delle piastre usate durante gli esperimenti, oltre alle cellule adese al fondo, è presente anche il mezzo di coltura. Quest'ultimo è caratterizzato da una buona

conducibilità, per cui il campo magnetico che le attraversa, dà origine ad un campo elettrico posto in direzione perpendicolare ad esso, che dunque ruota dal fondo della Petri stessa, sale fino alla superficie del mezzo, per poi ridiscendere verso il fondo (Figura 5.4). la presenza del mezzo genera quindi un campo elettromagnetico, in cui, in corrispondenza di un massimo di campo elettrico si trova un massimo di campo magnetico, proprio come nei segnali emessi dalle antenne.

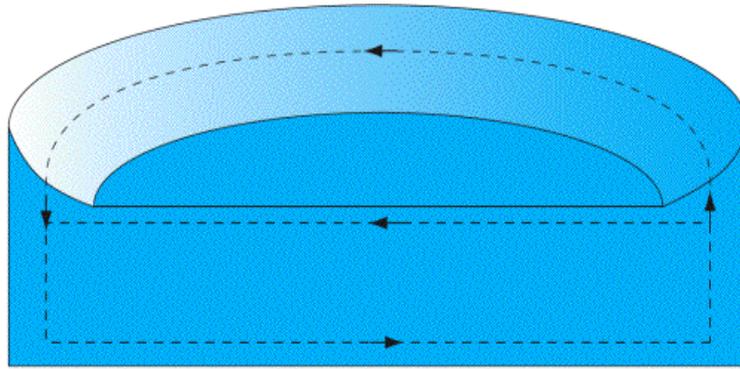


Figura 5.4 Rappresentazione di una piastra Petri contenente mezzo di coltura. Le frecce descrivono il campo elettrico indotto all'interno della piastra.

La frequenza portante durante gli irraggiamenti ripete periodicamente dei periodi espositivi in posizione “on” e “off”, in cui rispettivamente, il segnale viene emesso (per un tempo di 5 minuti) o non emesso (per un tempo di 10 minuti). La temperatura a cui è sottoposto il monostrato di cellule viene monitorata in continuo ed è uniformemente distribuita garantendo l'assenza di “hot spots” termici. Gli incrementi di temperatura dovuti alla produzione di campi elettromagnetici ad alta frequenza e le differenze della stessa tra le cellule irraggiate e quelle non irraggiate sono inferiori a 0.1 °C per unità di SAR.

Il SAR (tasso di assorbimento specifico di energia, misurato in W/kg di massa biologica) è un parametro fondamentale da tenere sotto controllo in questo tipo di esperimenti. In particolare va menzionato che:

- il SAR dipende quadraticamente dall'intensità del campo elettrico indotto;
- il SAR varia al variare della quantità di mezzo di coltura, in quanto una maggiore o minore quantità dello stesso cambia l'area della superficie di mezzo che interseca perpendicolarmente il campo magnetico, generando una maggiore o minore induzione di campo elettrico;
- il SAR dipende linearmente dalla conducibilità del mezzo di coltura, infatti una maggiore conducibilità del mezzo garantisce un'interazione migliore col campo elettrico;

- il SAR varia al variare della distanza dal fondo della Petri (Figura 5.5), per cui le cellule devono essere a confluenza durante l'irraggiamento, ma non possono essere disposte in multistrato.

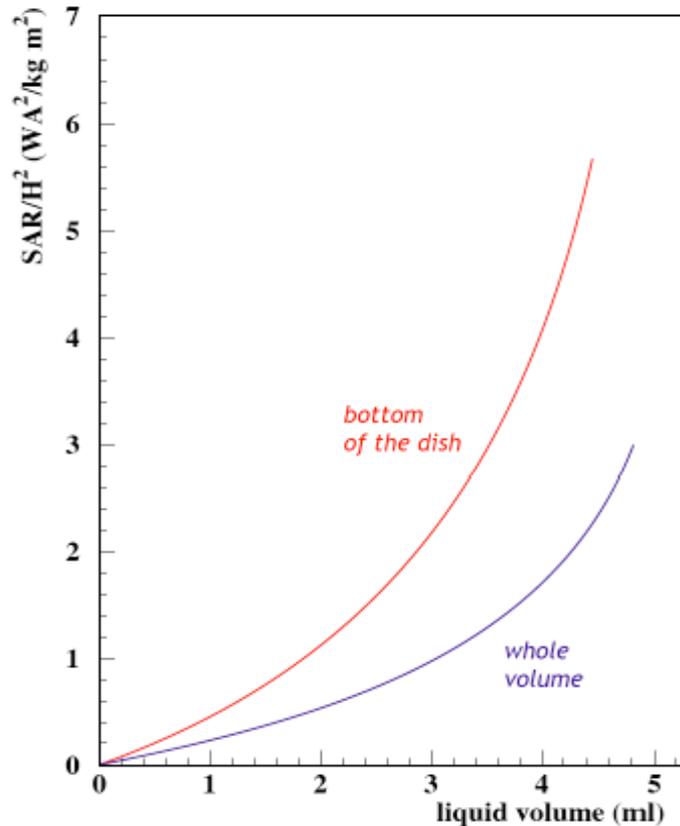


Figura 5.5 Andamento del SAR in relazione alla quantità di mezzo presente in ogni Petri.

5.2.1 Modalità di Irraggiamento

Tutti gli esperimenti sono svolti a frequenza portante di 1.8 GHz con esposizione intermittente (5 minuti *on* 10 minuti *off*). Il sistema di esposizione permette di effettuare degli esperimenti utilizzando diverse modalità di irraggiamento. Queste sono impostate mediante il software che gestisce il funzionamento dell'irraggiatore e sono:

- **Continuos Wavelength signal (CW);**
- **GSM-217 Hz amplitude modulation;**
- **GSM-Talk.**

Nella modalità di irraggiamento CW, le cellule sono esposte ad un segnale caratterizzato da una frequenza portante di 1.8 GHz emessa in continuo senza modulazione d'impulso.

Con la modulazione d'impulso a 217 Hz, invece viene simulato il TMDA (time division multiple access), ossia la suddivisione in slot temporali tipica del segnale GSM. In

questo caso, ogni frame della durata di 4,608 ms, viene suddiviso in 8 slot temporali da 576 μ s e solo in uno di questi avviene l'emissione del segnale. Poichè per motivazioni di carattere tecnico un frame su 26 viene lasciato inattivo si introduce una modulazione d'impulso ulteriore di circa 8 Hz (217 Hz / 26) al segnale già attivo. Questo è il segnale caratteristico di un telefono in emissione.

Nel segnale GSM-Talk viene alternata la modalità GSM-217 Hz a quella GSM-DTX (discontinuous transmission) in cui la trasmissione del segnale si riduce a periodi molto brevi (12 frames attivi su 104 frames) durante la fase di ascolto di un telefono cellulare. Questa modalità di irraggiamento derivante dall'alternanza di tali segnali, permette di simulare una conversazione telefonica in continuo (34% di parlato e 66% di ascolto).

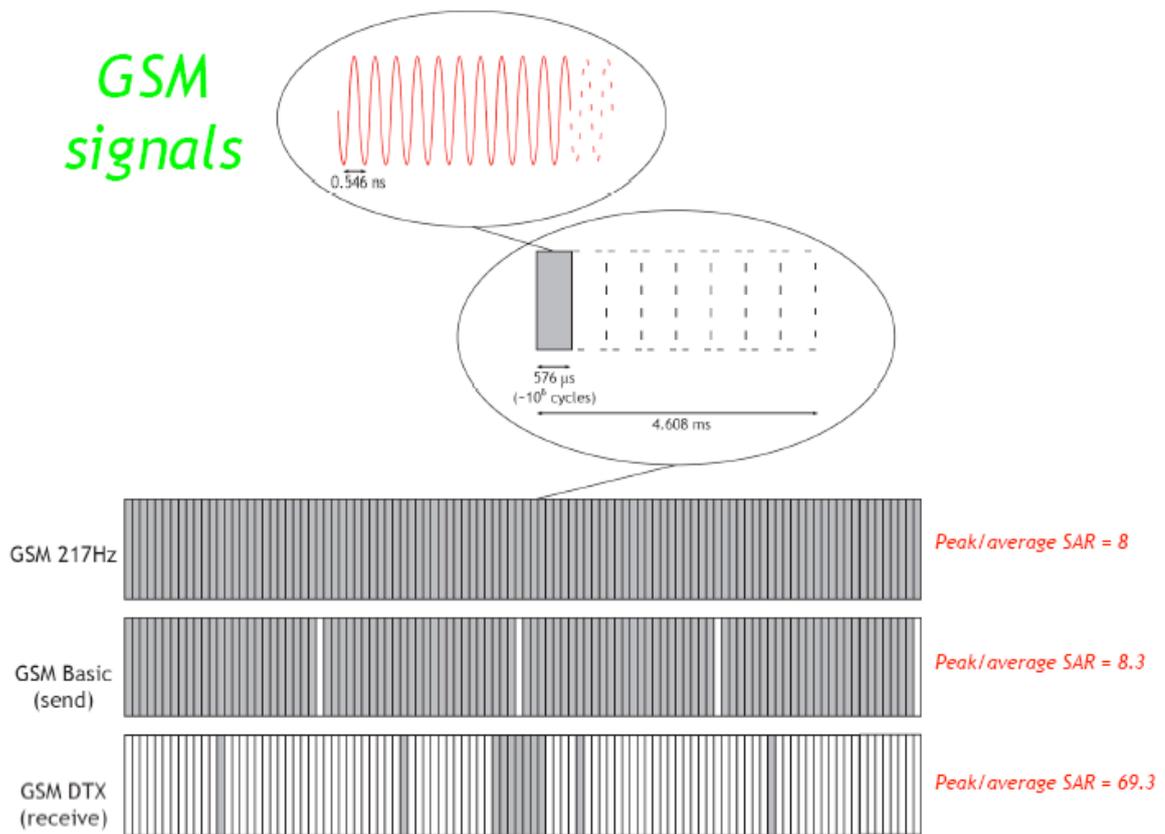


Figura 5.6 Rappresentazione del segnale nelle diverse modalità di irraggiamento.

5.2.2 Condizioni Sperimentali

Per avviare un irraggiamento bisogna eseguire una serie di operazioni di base per il settaggio del sistema espositivo e per la preparazione del campione.

Come prima cosa, per gli esperimenti si utilizzano cellule arrivate ad una situazione di confluenza del 70-80%, il che significa che hanno ricoperto quasi tutta la superficie della Petri, ma sono ancora presenti alcuni spazi vuoti che ne permettono il buono stato di salute. In seguito viene eseguita la preparazione del campione per gli esperimenti, effettuata come è stato già descritto nel paragrafo 5.1.4 di questa Tesi.

Mediante un software vengono quindi settati i parametri dell'irraggiatore che permettono di eseguire l'esperimento nella modalità di esposizione prestabilita, tenendo sotto controllo la temperatura interna delle guide d'onda, impostando la durata dell'irraggiamento e il valore di SAR medio opportuno. Gli esperimenti sono stati effettuati nelle tre modalità di irraggiamento, CW, GSM 217 Hz, GSM Talk, con segnale intermittente 5 min ON/10 min OFF per tre diversi periodi di esposizione: 4, 16 e 24 ore. Il valore di SAR medio utilizzato negli irraggiamenti è stato di 2 W/kg. Durante ogni esperimento sei Petri vengono poste nella guida d'onda dove verrà generato il campo elettromagnetico e sei in quella di controllo o *sham* in maniera tale da garantire un campione di controllo, non irraggiato, ma comunque sito nelle stesse condizioni del campione esposto. Il computer decide autonomamente in quale delle due guide d'onda generare il campo elettromagnetico, in modo da permettere di eseguire gli esperimenti in cieco e garantire la massima oggettività nelle analisi che verranno svolte in seguito. Alla fine dell'irraggiamento è possibile conoscere quale delle due camere è stata soggetta al campo elettromagnetico, grazie al supporto dei Laboratori del Politecnico di Zurigo, che decriptano il *file* che si genera in seguito all'esperimento e ci inviano il risultato dello stesso. Inoltre, una serie di Petri viene mantenuta nell'incubatore impiegato per mantenere le cellule in linea, per avere sempre un controllo esterno rispetto al campione sham e irraggiato.

5.3 METODI DI ANALISI

5.3.1 Preparazione del campione per il saggio di attività enzimatica

Le cellule esposte a campi elettromagnetici subiscono una serie di trattamenti al fine di isolare il materiale proteico mediante la rottura delle membrane cellulari, e la separazione delle stesse dal surnatante contenente le proteine citoplasmatiche. In seguito al trattamento sperimentale, alle cellule viene tolto il mezzo base con una pipetta pasteur. Successivamente le cellule subiscono un lavaggio con PBS a 4°C (1 mL), quindi vengono staccate dalla superficie di adesione mediante l'utilizzo di uno *scraper*, ossia un opportuno raschietto di plastica, in presenza di PBS freddo. Si lava con ulteriori 400 µL di PBS freddo e le cellule così staccate vengono trasferite in eppendorf da 1,5 mL e centrifugate a 800 x g a 4°C per 10 minuti allo scopo di raccogliere le cellule, facendole precipitare sul fondo della eppendorf. In seguito si elimina il surnatante e si risospende il pellet di cellule in 50 µL di tampone di lisi (Tergitol-type NP40 1% in tampone fosfato pH 7.2 10 mM) allo scopo di rompere le membrane ed estrarre il materiale proteico. Le cellule, vengono lasciate a lisarsi per 1 ora a 4°C, ed in seguito vengono centrifugate a 3000 x g per 10 minuti, al fine di eliminare i residui cellulari più grandi prodotti dalla lisi. In seguito alla lisi cellulare otteniamo un estratto contenente tra le altre proteine, l'AChE totale delle PC12; questo protocollo infatti non è specifico per la rilevazione delle varie isoforme di AChE. A questo punto si preleva il surnatante, si mettono 20 µL di campione in 60 µL di NaOH (diluizione 1:4) per la determinazione della concentrazione proteica e si congela il resto del campione a -80°C.

5.3.2 Determinazione della concentrazione di proteine

La determinazione delle proteine viene fatta mediante metodo Lowry (1951) ed eseguita con l'ausilio del lettore micropiastre EL 808 BioTek. Questo saggio prevede due fasi: nella prima gli ioni Cu^{2+} presenti nella soluzione B (CuSO_4) reagiscono in ambiente basico con i gruppi CO-NH_2 delle proteine dando una colorazione violetta. Nella seconda fase, un complesso Cu-proteine riduce gli acidi fosfotungstenico e fosfomolibdico contenuti nel rattivo di Folin a blu di tungsteno e blu di molibdeno. L'utilizzo del lettore micropiastre nella lettura dell'assorbanza del campione consente di analizzare fino a 18 campioni contemporaneamente. Per prima cosa si preparano le diluizioni dello standard

costituito da una proteina nota, e cioè l'*albumina bovina serica* (BSA, Sigma), partendo da una aliquota madre 0.5 mg/mL. Da questa si effettuano delle diluizioni al fine di ottenere cinque soluzioni di standard per avere rispettivamente una quantità di albumina per pozzetto pari a 10 µg, 7.5 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1 µg. Questi standard noti servono per correlare le misure di assorbanza effettuate dal lettore ad una concentrazione, in maniera tale da poter ricavare in seguito i parametri della retta di taratura e utilizzarli per risalire alla concentrazione delle proteine di interesse. Una volta preparati i campioni degli standard, si prepara una soluzione di NaOH + H₂O 1:5 (es. 300 µL NaOH + 1500 µL H₂O) e si mettono 60 µL di questa soluzione per ogni pozzetto. In seguito si aggiungono 40 µL di H₂O nei pozzetti deputati alla lettura del bianco, e 40 µL di soluzioni di standard noto nei pozzetti deputati alla lettura degli standard. Una volta preparata la parte della piastra per la lettura del bianco e delle soluzioni degli standard, si prepara la mix per ogni campione da saggiare in quadruplicato, aggiungendo a 450 µL di H₂O, 50 µL di campione, e poi mettendo 100 µL di questa soluzione all'interno di ogni pozzetto. Si posiziona la piastra nel lettore e in ogni pozzetto così preparato si aggiungono 200 µL di un reattivo costituito da 100 parti di soluzione A (Na⁺, K⁺-tartrato 20%, Na₂CO₃ 2% e NaOH 0.4%) e una parte di soluzione B. Nel frattempo si prepara la soluzione C costituita da Folin e H₂O in rapporto 1:1 considerando di doverne aggiungere 20 µL per pozzetto. Dopo 10 minuti di incubazione con la soluzione A + B, si aggiunge il Folin, 20 µL/pozzetto e dopo 30 minuti si effettuano le letture a 650 nm. Una volta eseguite le letture di assorbanza, che rappresentano un'indicazione della quantità di proteine presenti nel nostro campione, si costruisce la retta di taratura con le soluzioni degli standard e utilizzando i parametri di questa retta nota, si risale alla concentrazione di proteine nel nostro campione mediante l'equazione della retta:

$$y = mx + q$$

dove: m e q sono i parametri derivanti dalla retta degli standard;

y è il valore di assorbanza registrato dal lettore;

x è la concentrazione delle proteine di interesse;

5.3.4 Saggio enzimatico per l'attività di AChE

Il saggio enzimatico per valutare l'attività dell'acetilcolinesterasi viene effettuato con il metodo Ellman (1961). Questo metodo prevede l'utilizzo di un reattivo, l'acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) noto come DTNB o reattivo di Ellman, che è un composto chimico impiegato per misurare la quantità di gruppi tiolici. Il composto reagisce in questo caso con la tiocolina prodotta in seguito all'azione enzimatica dell'AChE sul substrato acetiltiocolina, e rilascia nitrobenzoato (TNB), che ha un forte colore giallo. Questa reazione è rapida e stechiometrica: una mole di tiolo produce il rilascio di una mole di TNB, che può essere quantificato impiegando uno spettrofotometro e misurando l'assorbanza a 405 nm, usando un coefficiente di estinzione di $13300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A partire dalle concentrazioni di proteine ottenute mediante il Lowry, si calcola quanto campione mettere nel saggio per saggiare un'uguale concentrazione di proteine pari a 0.05 mg/mL, quindi per mettere in ogni provetta 0.06 mg di proteine. Prima di iniziare il saggio si scalda il Tampone Fosfato (fosfato bibasico 10 mM pH 7.2) a 30°C, in seguito si prepara la soluzione di DTNB 8 mM. Si mescola il DTNB così preparato, si copre con carta stagnola perchè il colorante è sensibile alla luce e lo si tiene caldo a 30°C. Si prepara una master mix per tutti i campioni mettendo in una falcon il tampone fosfato, il DTNB e il nostro campione sperimentale che contiene l'enzima. Questa operazione va fatta tenendo conto che il saggio si esegue in un volume finale di 1200 µL (all'interno della cuvetta dello spettrofotometro), di cui il DTNB nel volume di 50 µL, il substrato ASCh 12 mM anch'esso nel volume di 50 µL, il campione sperimentale nell'opportuno volume contenente 0.06 mg di proteine (calcolato mediante Lowry) e il tampone fosfato nella rimanente parte. A questo punto si distribuisce nelle cuvette la soluzione derivante da questa mix nella misura di 1150 µL per cuvetta, si aggiungono 50 µL di tampone nel bianco e 50 µL di substrato ASCh impostando la lettura a 405 nm per 10 minuti. Una volta ottenute le misure di assorbanza mediante spettrofotometro Beckman Culter DU 800 si risale alla concentrazione di tiocolina, (e quindi unità di acetilcolinesterasi), mediante la relazione di Lambert-Beer e dividendo per il tempo e i mg di proteina si ricava l'*attività dell'enzima* indicata come *nanomoli di prodotto per mg di proteina per minuto*:

$$A = \epsilon \times b \times c \text{ (Legge di Lambert-Beer)}$$

dove: A è l'assorbanza misurata dallo spettrofotometro;

ε 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.

Seguendo lo stesso protocollo è stata valutata anche la cinetica enzimatica, al fine di seguire la reazione enzimatica al variare della concentrazione del substrato. A questo scopo sono state effettuate letture con 16 differenti concentrazioni di substrato ASCh (da 0.001 mM a 6 mM) in maniera tale da poter valutare la cinetica relazionando tra loro l'attività enzimatica e le concentrazioni crescenti di substrato ASCh. Questo ha permesso in seguito di valutare le costanti cinetiche che la caratterizzano ossia la V_{\max} e la K_m .

5.3.5 Analisi dell'espressione proteica

L'analisi dell'espressione proteica è stata svolta mediante Western Blotting, una tecnica utilizzata allo scopo di separare le proteine contenute in una miscela, esclusivamente in base al loro peso molecolare. Il metodo prevede inizialmente una corsa elettroforetica dei campioni contenenti le proteine cellulari su una matrice semisolida (*gel*) costituita da maglie di diversa grandezza; questo permette la separazione delle proteine presenti nel campione. In seguito si esegue un'operazione di trasferimento delle proteine dal gel ad un foglio di nitrocellulosa, che viene così incubato con anticorpi in grado di legarsi in maniera specifica alla proteina di interesse. Infine, le bande proteiche vengono rilevate mediante reazione con luminolo, impressionate su una lastra fotografica e analizzate con l'ausilio di software per l'analisi d'immagine. Questo metodo si divide in più fasi, che verranno di seguito descritte.

a) Preparazione del campione per Western Blotting

La procedura di preparazione del campione per Western Blotting è simile alla metodica già illustrata per la determinazione dell'attività enzimatica, le uniche variazioni sopraggiungono a partire dalla lisi delle cellule. Infatti, in questo caso, dopo aver eliminato il surnatante si procede risospesendo il pellet di cellule in un'opportuna quantità di tampone di lisi allo scopo di estrarre il materiale proteico. Questa operazione viene eseguita in presenza di inibitori delle proteasi in quantità pari ad 1/10 del tampone di lisi, per evitare che queste liberate dalla rottura delle membrane vadano a degradare le proteine.

Le cellule vengono lasciate in tampone di lisi così composto NP40 1% in tampone fosfato pH 7.2 10 mM a 4°C per circa 30 minuti, in seguito il lisato viene centrifugato a 9000 x g a 4 °C per 20 minuti. A questo punto, una parte del campione proteico viene prelevato per la determinazione delle proteine (20 µL da diluire in 60 µL di NaOH 1 N), mentre al resto del campione viene aggiunto tampone di Laemli (Tris HCl 1 M, pH 6.8, SDS 0,28 M, glicerolo 5,46 M, 2-mercaptoetanolo 20%, blu di bromofenolo 1mM), in proporzione 3:1. In seguito il campione viene bollito per 5 minuti e riposto in freezer a -20°C per essere utilizzato in seguito per l'analisi mediante Western Blotting. Anche in questo caso il protocollo di preparazione del campione consente di ottenere un estratto contenente tra le altre proteine l'AChE totale senza distinguere tra le varie isoforme.

b) Preparazione del gel per l'elettroforesi

Nell'eseguire la metodica del Western Blotting per prima cosa bisogna preparare un gel per la migrazione elettroforetica. Questa avviene su un gel di poliacrilamide composto da due parti, una inferiore denominata gel di corsa (Running Gel), ed una superiore denominata gel di caricamento (Stacking Gel). La prima operazione è la preparazione del gel di corsa fatto miscelando tra loro:

- 3,47 mL di tampone di corsa (Lower Buffer), la cui composizione per 250 mL è:
 - Tris-base 45,41 g pH 8.8 (Sigma) ;
 - SDS (*dodecilsolfato di sodio*) 1 g (Sigma) ;
 - H₂O distillata.
- 3,27 mL di H₂O distillata;
- 4,47 mL di soluzione di poliacrilamide al 30% la cui composizione è per 100 mL:
 - Acrilamide 29,2 g (Sigma);
 - N'N' Bismetilacrilamide 0,8 g (Sigma);
 - H₂O distillata.
- 40 µL di una soluzione al 10% di ammonio persolfato (Sigma);
- 4,8 µL di TEMED (N,N,N'N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma).

L'ammonio persolfato e il TEMED sono i due catalizzatori della reazione di polimerizzazione dell'acrilamide, perciò verranno aggiunti alla miscela di reazione solo all'ultimo momento, prima di colare il gel negli appositi supporti. La miscela per il gel di corsa così preparata viene fatta colare all'interno di due vetri che costituiscono il supporto entro cui solidificherà il gel, e tale operazione viene svolta utilizzando una siringa, fino al

raggiungimento del livello indicato dal supporto. La rimanente parte del supporto in vetro viene riempita con H₂O distillata al fine di evitare che il gel si secchi durante i 45 minuti necessari per la polimerizzazione. Trascorso questo periodo si procede con la preparazione del gel di caricamento fatto miscelando tra loro:

- 1,5 mL di tampone di caricamento (Upper Buffer), la cui composizione per 250 ml è:
 - Tris-base 15,15 g pH 6.8 (Sigma) ;
 - SDS 1 g (Sigma) ;
 - H₂O distillata.
- 3,7 mL di H₂O distillata;
- 1 mL di poliacrilamide;
- 30 µL di ammonio persolfato;
- 6 µL di TEMED.

Prima di colare la soluzione all'interno del supporto occorre asciugare l'acqua messa precedentemente sopra al gel, utilizzando carta assorbente, quindi una volta riempito tutto lo spazio rimanente sopra al gel di corsa con la soluzione del gel di caricamento, si inseriscono i pettini per consentire la formazione dei pozzetti entro i quali caricare successivamente il campione. Anche in questo caso il gel viene lasciato polimerizzare per 45 minuti. L'apparecchiatura Mini Protean III utilizzata per questa fase, permette di preparare due gel per volta; per cui i volumi delle soluzioni sopra riportati sono quelli utili per la preparazione di due gel.

c) Caricamento del campione per l'elettroforesi

Dopo la polimerizzazione del gel, si tolgono i pettini lasciando così il pozzetto libero per il caricamento dei campioni e si dispongono i supporti contenenti i due gel dentro la vaschetta per l'elettroforesi in presenza di tampone di corsa. Quest'ultimo viene preparato per diluizione 1:5 di una soluzione madre 5 x così composta:

- Tris-base 15,135 g pH 8.3;
- Glicina 72,096 g (Sigma);
- SDS 5 g
- H₂O distillata.

L'SDS è un detergente anionico che si lega saldamente alle proteine e ne provoca la denaturazione. In presenza di SDS le proteine acquisiscono una quantità di carica negativa

costante per unità di massa, così tutti i complessi proteina-SDS si muoveranno verso l'anodo e, per le proprietà di setaccio del gel, la loro mobilità (e quindi la distanza percorsa dopo un determinato intervallo di tempo) risulta inversamente proporzionale al loro peso molecolare. Il campione sperimentale da caricare viene quindi scongelato, e caricato in quantità non superiore a 20 μL ; la concentrazione di campione è stata ottenuta anche in questo caso mediante protocollo di Lowry e in questi esperimenti abbiamo caricato il volume di campione contenente 30 mg di proteine. A questo punto si collegano gli elettrodi dell'alimentatore e si fa passare una corrente a 28 mA per un 1,30 ore. Facendo correre insieme al campione un marcatore di peso molecolare noto è possibile risalire al peso molecolare delle proteine del campione.

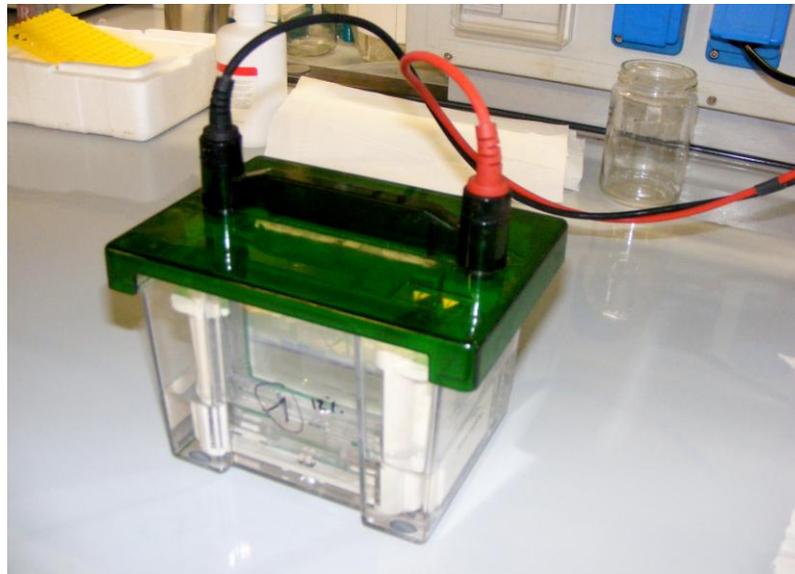


Figura 5.7 Apparecchiatura per la corsa elettroforetica.

d) Fase di Trasferimento (Blotting)

Al termine dell'elettroforesi le proteine sono completamente migrate e separate all'interno delle maglie del gel. A questa segue una fase di trasferimento delle stesse dal gel ad un supporto di nitrocellulosa, per rendere più semplice la rivelazione immunologica con luminolo. Per prima cosa occorre liberare i gel dai supporti in vetro e metterli ad equilibrare per circa 15 minuti in una soluzione di trasferimento (TTB a 4°C) così composta:

- Tris-base 0.03 M;
- Glicina 0.2 M;

- Metanolo 20% v/v.

Per comodità si taglia l'angolo in basso a destra del gel, per sapere in ogni momento qualè il lato esatto in cui si trovano le proteine. Trascorsi i 15 minuti in TTB si prepara il gel al trasferimento, disponendo all'interno di una *cassetta clump* i vari elementi per il trasferimento nel seguente ordine:

- Pannello chiaro della cassetta (anodo);
- Spugna;
- Carta da filtro;
- Foglietto di nitrocellulosa;
- Gel;
- Carta da filtro;
- Spugna;
- Pannello scuro della cassetta (catodo).

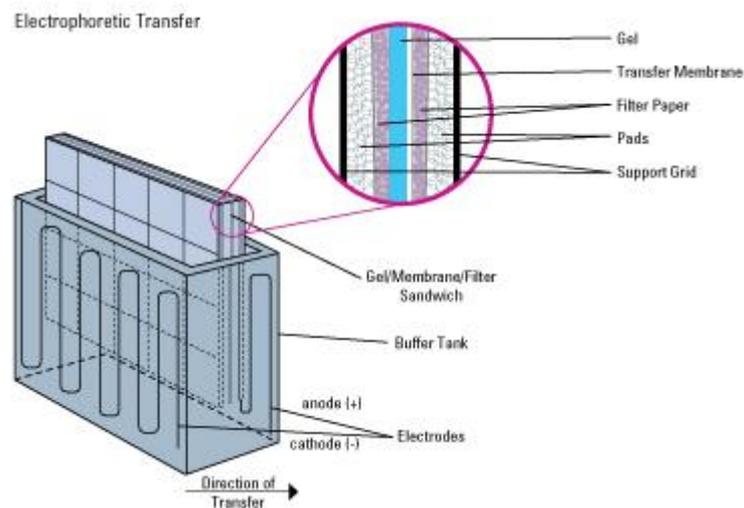


Figura 5.8 Preparazione del “panino” per la fase di trasferimento.

Prima di avviare il trasferimento ci si assicura che non ci siano bolle tra la carta e la nitrocellulosa, in seguito, si dispone il “panino” così costruito nella camera del blotting riempita con TTB, mettendo il pannello chiaro rivolto verso la faccia rossa dell’elettrodo e il pannello scuro verso quella nera. Si aggiunge un panetto di ghiaccio nella cavità predisposta, al fine di non far surriscaldare troppo il tampone e si avvia il trasferimento fissando l’amperaggio a 300 mA per un’ora. Finito il blotting, si smonta il supporto e si mette la nitrocellulosa in una vaschetta con *Rosso Ponceau*, un colorante che si lega alle proteine e permette di vedere se il trasferimento è avvenuto senza problemi, andando ad evidenziare tutte le bande relative alle proteine migrate. In seguito si mette il foglio di nitrocellulosa in una vaschetta con un tampone di bloccaggio composto da TBS-Tween

(Tris 0,02 M, NaCl 0,14 M, Tween 0,1 % v/v pH 7.6) e BSA al 3% v/v, per tutta la notte a 4°C. Questa operazione ha lo scopo di saturare con abbondante proteina aspecifica (BSA), tutti i siti della nitrocellulosa non occupati dalle proteine del campione, fissandole così nella posizione in cui si trovano.

e) Rivelazione Immunologica

La rivelazione immunologica è l'ultima fase del Western Blotting e consente di identificare in maniera specifica la proteina in esame (in questo caso l'acetilcolinesterasi). Consta di tre fasi principali:

- a) Incubazione con un anticorpo primario;
- b) Incubazione con un anticorpo secondario;
- c) Rivelazione delle bande con luminolo.

Nella prima fase, dopo aver sottoposto la nitrocellulosa a tre lavaggi da 5 minuti ognuno con TBS-Tween 0.1% in agitazione, per rimuovere l'eccesso di BSA, si procede con l'incubazione della nitrocellulosa con l'anticorpo primario. Quest'ultimo è una molecola in grado di riconoscere selettivamente la proteina di interesse e di legarsi a livello di una sequenza aminoacidica caratteristica. Gli anticorpi, sia primari che secondari, vengono conservati in aliquote a -20°C, e quindi diluiti solo al momento dell'utilizzo nell'opportuna quantità di TBS-Tween + BSA. L'anticorpo primario utilizzato per la rivelazione dell'acetilcolinesterasi è stato l'AChE (E-19): sc-6432 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) con il quale abbiamo rilevato una banda a 70 kDa. L'anticorpo primario utilizzato si lega in maniera specifica alla subunità catalitica dell'AChE, che rimane uguale per le varie isoforme, per cui con questo metodo non si distingue tra esse, ma si fornisce una stima della totalità dell'AChE espressa. La diluizione a partire dalla soluzione madre in uso è stata fatta 1:200, diluendo 10 µL di questa in 2 mL di soluzione TBS-Tween + BSA 0.1%. L'incubazione solitamente avviene all'interno di bustine di plastica, dove si posizionano al massimo due nitrocellulose e vi si aggiungono 1 mL per lato di anticorpo. La bustina così preparata, viene sigillata, e posta in agitazione a temperatura ambiente per un'ora. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo primario, la nitrocellulosa viene sottoposta a tre lavaggi da 10 minuti l'uno con TBS-Tween 0.1% in agitazione, al fine di asportare le molecole di anticorpo non legate. In seguito si prepara la nitrocellulosa per l'incubazione con l'anticorpo secondario. Quest'ultimo è una molecola in grado di legarsi in maniera specie-specifica all'anticorpo primario. L'anticorpo

secondario utilizzato per la rivelazione dell'acetilcolinesterasi è stato l'anti-goat IgG-HRP: sc 2020 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). La diluizione a partire dalla soluzione madre in uso è stata fatta 1:2000, diluendo 1 μL di questa in 2 mL di TBS-Tween + BSA. La modalità di incubazione rimane uguale a quella proposta per l'incubazione con l'anticorpo primario. Dopo un'ora di incubazione con il secondario, la nitrocellulosa viene sottoposta ad alcuni lavaggi con TBS-Tween 0.1% (tre da 5 minuti e tre da 10 minuti), al fine di rimuovere tutto l'anticorpo che non si è legato, in maniera tale da ridurre interferenze durante la fase di rivelazione con luminolo. Questa è l'ultima fase della metodica e prevede l'utilizzo di una miscela di LUMINOLO 1 + LUMINOLO 2 in rapporto 1:1 (di solito 1 mL + 1 mL, da utilizzare per due nitrocellulose). Questo consente di rilevare le bande dell'acetilcolinesterasi sfruttando le proprietà di chemiluminescenza del luminolo. Infatti, l'enzima perossidasi presente sull'anticorpo secondario, catalizza l'ossidazione del luminolo (una molecola di diacilidrazide ciclica), che viene così a trovarsi in uno stato eccitato, dal quale decade mediante emissione di luce. L'emissione di luce avviene alla lunghezza d'onda di 428 nm e può essere rilevata mediante l'esposizione di una lastra fotografica sul quale le bande proteiche vengono facilmente impressionate.

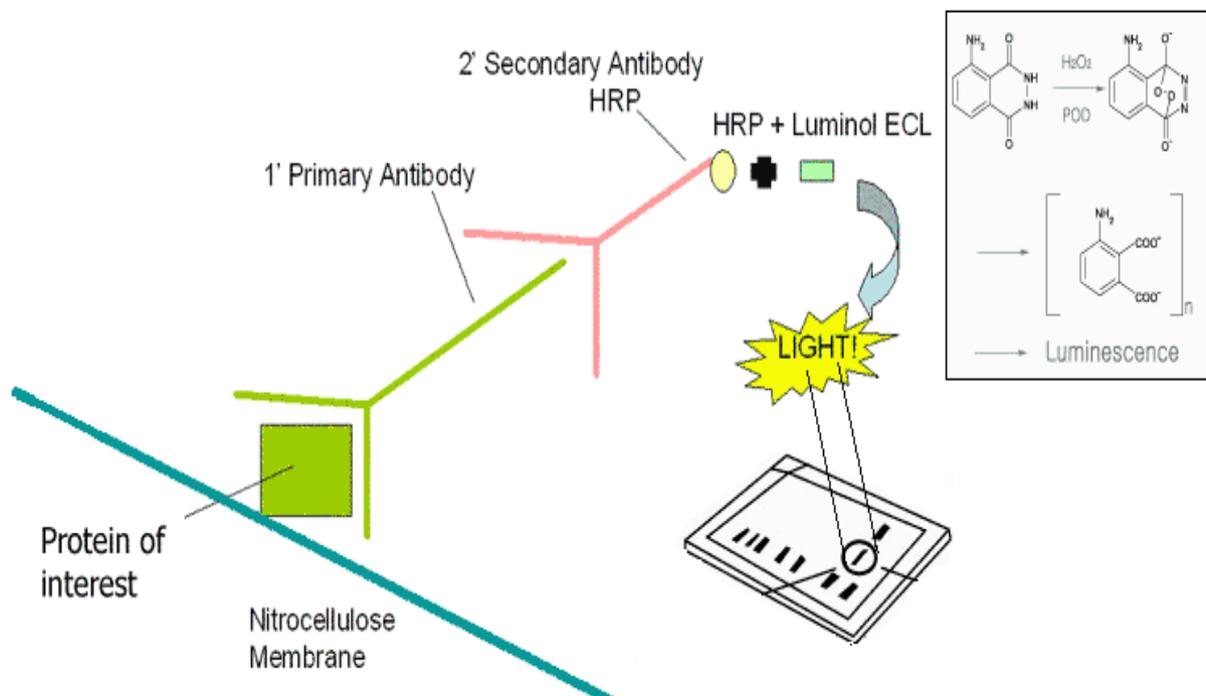


Figura 5.9 Principio della rivelazione immunologica.

Per eseguire la rivelazione con luminolo, una volta terminati i lavaggi delle nitrocellulose con TBS-Tween 0.1%, occorre asciugarle bene e disporle su un apposito

supporto da portare in *camera oscura*. Qui si prepara la miscela di luminolo, si distribuisce uniformemente sui due fogli di nitrocellulosa e si dispone su di essi un foglio di plastica lucida e trasparente, per evitare il contatto tra il luminolo e la lastra fotografica. In seguito si poggia la lastra fotografica sul supporto e si attende che la lastra venga impressionata. Durante gli esperimenti per la rilevazione dell'acetilcolinesterasi effettuati per questo lavoro di Tesi è stato stimato un tempo ottimale di esposizione della lastra compreso tra 1 e 3 minuti. In seguito la lastra viene immersa per 10 secondi in una soluzione di sviluppo, lavata con acqua distillata e lasciata per circa 20 minuti immersa in una soluzione di fissaggio. Terminata questa fase la lastra fotografica viene lavata sotto acqua corrente e lasciata ad asciugare in camera oscura per tutta la notte; il giorno seguente viene effettuata l'analisi densitometrica delle bande per mezzo del software ImageMaster Total Lab v.100 (Amersham), dopo aver opportunamente acquisito mediante scanner le fotografie al computer. L'analisi di immagine fornisce i valori di intensità di pixel delle bande proteiche, che verranno successivamente elaborate mediante fogli di calcolo.

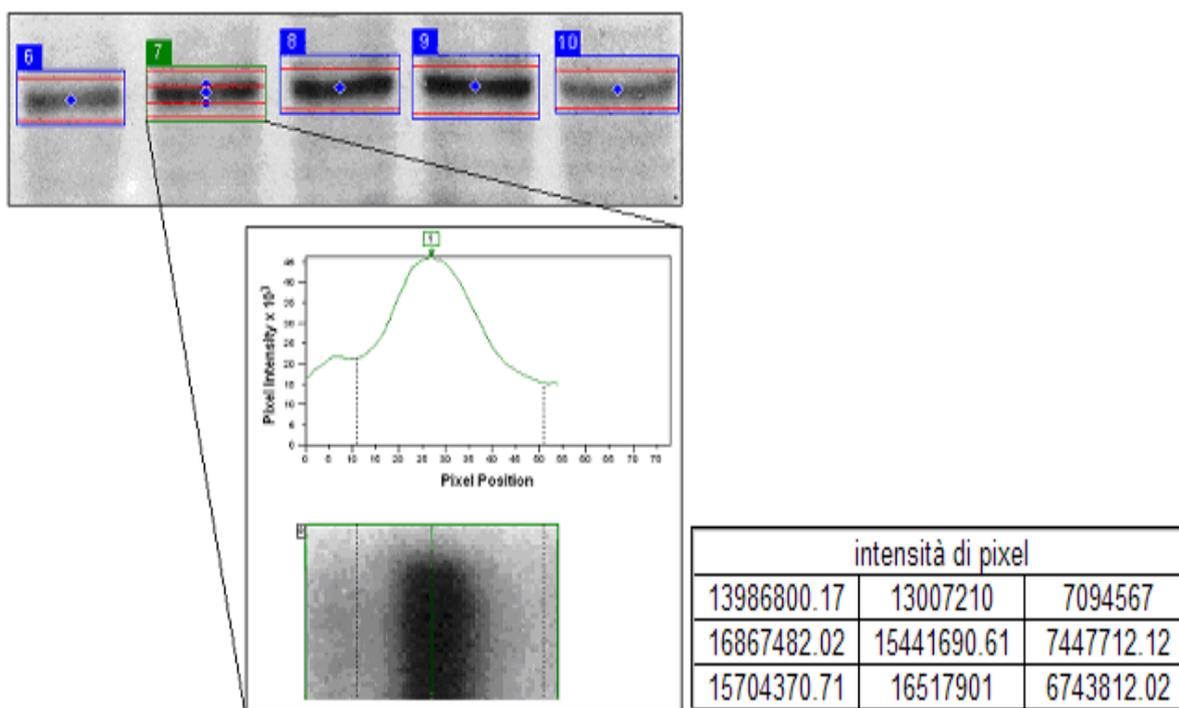


Figura 5.10 Esempio di analisi di immagine effettuata su bande proteiche di AChE.

5.3.6 Analisi dell'espressione genica

L'analisi dell'espressione genica esamina la composizione di RNA messaggeri di una cellula identificando i trascritti e valutando la loro espressione nel campione in esame.

a) Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato ottenuto da 3 piastre Petri per ogni campione (controllo, sham e trattato), contenenti un totale di circa 5×10^6 cellule. Il metodo di estrazione seguito prevede l'utilizzo del kit Charge Switch (Invitrogen) in accordo con il protocollo fornito dal produttore. L'RNA totale estratto è stato risospeso in un opportuno volume di acqua micro-filtrata sterile trattata con di-etil-pirocarbonato (*acqua DEPC*, Invitrogen), ed è stato effettuato un controllo quantitativo mediante lettura spettrofotometrica. L'RNA è stato quindi opportunamente diluito in acqua DEPC (5 μ L di RNA totale in 55 μ L 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 MBA100 Perkin Elmer. Per risalire al valore di concentrazione dell'RNA totale, si tiene conto del fatto che 1 ml di soluzione acquosa contenente 40 μ g di RNA, a 260 nm fornisce un valore assorbanza pari a 1:

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

dove A_{260} rappresenta la lettura dell'assorbanza a 260 nm.

A questo punto, dalle concentrazioni di RNA così ottenute, si risale al volume di RNA totale da aggiungere alla miscela di reazione per la *retrotrascrizione*, in modo da caricare la stessa quantità di RNA per ogni campione.

b) Retrotrascrizione

La Retrotrascrizione (o trascrizione inversa) è la capacità di particolari enzimi di sintetizzare una molecola di DNA a partire da RNA. L'enzima in grado di svolgere questo processo è la *Trascrittasi Inversa*, che deve il nome proprio al fatto che è in grado di compiere il passaggio inverso rispetto agli enzimi responsabili della trascrizione, che cioè sintetizzano RNA a partire da DNA. La trascrittasi inversa è stata finora identificata nel genoma dei retrovirus, dai quali viene utilizzata per copiare l'informazione contenuta nel

genoma retrovirale (che è costituito da RNA) in una molecola di DNA a doppio filamento che può così integrarsi (inserirsi) nel genoma della cellula ospite, dal quale può venire poi normalmente trascritto dando origine sia alle proteine virali che al genoma virale stesso. In questo modo il virus può rimanere in forma latente anche per molti anni.

La reazione di retrotrascrizione viene normalmente utilizzata in biologia molecolare per generare dei *DNA complementari* (o *cDNA*) utilizzando come stampo l'RNA ottenuto dai campioni di cellule o di tessuti. Generalmente, si utilizza come stampo per la reazione di retrotrascrizione l'RNA messaggero (mRNA). Tutte le molecole di mRNA eucariotico contengono nella loro estremità 3' una coda di 15-20 nucleotidi di adenina denominata *coda poliA*. Tale coda è estremamente utile per l'inizio della reazione di retrotrascrizione, al fine di ottenere DNA complementari retrotrascritti esclusivamente dagli mRNA. Questa selezione è resa possibile grazie all'utilizzo di oligonucleotidi sintetici definiti *oligo(dT)*, che servono come innesco o *primer* per la trascrittasi inversa che esegue la sintesi del DNA a singolo filamento (Fig 5.11)

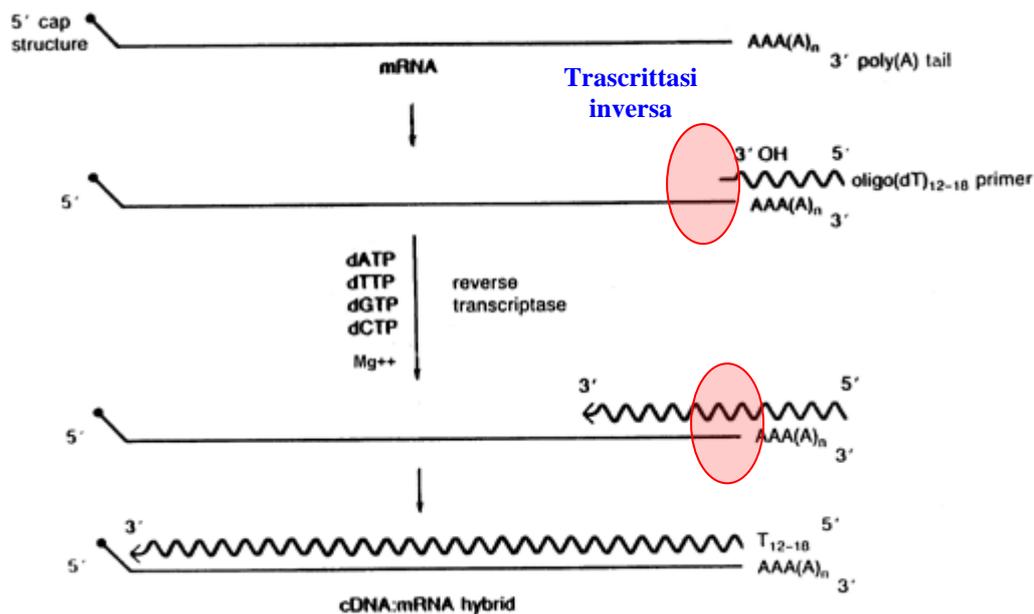


Figura 5.11 Rappresentazione della fase di Retrotrascrizione.

La strategia per la sintesi di cDNA utilizzata negli esperimenti per questo lavoro di Tesi, ha previsto l'utilizzo di primers a sequenza arbitraria (o *random primers*) al fine di massimizzare la resa della reazione di retrotrascrizione. I random primers sono oligonucleotidi composti da sei nucleotidi, e poiché ogni esamero possibile è presente, questi possono potenzialmente legarsi a tutta la sequenza di DNA. I random primers si appaiano in maniera arbitraria alla sequenza di DNA e sono utilizzati in una miscela di

dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP). Durante la fase di sintesi del filamento di DNA complementare, la trascrittasi inversa polimerizza nel filamento di sintesi i deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs) complementari alla sequenza del filamento stampo.



Figura 5.12 Rappresentazione del meccanismo di appaiamento dei random primers.

La retrotrascrizione avviene facendo fare degli step termici ai campioni sperimentali dai quali si è precedentemente estratto l'RNA.

1 µg di RNA totale viene retrotrascritto in presenza di 250 ng di *random primers* (Sigma) e 200 unità dell'enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas). La reazione di retrotrascrizione consiste di tre fasi d'incubazione:

- 10 min a 25°C (ibridazione dei random primers sui filamenti di RNA);
- 60 min a 45°C (retrotrascrizione);
- 10 min a 70°C (inattivazione dell'enzima).

c) Reazione a catena della DNA Polimerasi (PCR)

Il cDNA così ottenuto e corrispondente ai geni bersaglio, è stato selettivamente amplificato mediante PCR. La reazione a catena della DNA polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), messa a punto da Mullis nel 1984, permette l'amplificazione selettiva di singoli tratti genici, cioè la produzione *in vitro* di un elevato numero di copie di una specifica sequenza di DNA. LA PCR si basa sulle proprietà dell'enzima DNA polimerasi di ripetere *in vitro* ciò che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA, ossia la sintesi di nuovi filamenti complementari ad un filamento stampo, e sulla possibilità di mirare tale sintesi ad uno specifico tratto di DNA scegliendo opportunamente gli inneschi o *primer*. Questi sono oligonucleotidi sintetici lunghi 10-30 pb, complementari alle regioni fiancheggianti il frammento genico da amplificare. Appaiandosi a tali regioni, i *primer* costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia catena, dal quale la DNA polimerasi può iniziare la sintesi, ossia formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e l'estremità 5' del deossinucleotide tri-fosfato (dNTP) complementare allo stampo. Una miscela standard per una reazione di PCR è costituita da:

- l'enzima DNA polimerasi;
- i due primer in quantità equimolari;
- i quattro deossinucleotidi-fosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP,) in quantità equimolari;
- un tampone di reazione;
- il $MgCl_2$; il Mg^{2+} è necessario per l'attività della DNA polimerasi (in questo caso era già contenuto nel tampone di reazione);
- il cDNA.

La reazione di PCR consiste di vari cicli di amplificazione. Ogni ciclo a sua volta è costituito da tre fasi (Figura 5.13):

- *Denaturazione*: separazione dei due filamenti che costituiscono la doppia catena del DNA stampo per riscaldamento a 90-98°C;
- *Appaiamento degli inneschi (annealing)*: i *primers* si appaiano alle sequenze complementari sui due filamenti stampo; la temperatura di *annealing* è un parametro variabile capace di determinare la specificità della reazione, quindi può variare in funzione dei frammenti che devono essere amplificati e dei *primer* utilizzati, ma in generale è compresa tra i 40 e 60°C;
- *Estensione*: allungamento del frammento di neosintesi ad opera della DNA polimerasi che catalizza la formazione dei legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del primer e il gruppo fosfato legato al carbonio 5' del dNTP entrante complementare allo stampo. La temperatura di estensione dipende dal tipo di DNA polimerasi che si usa: ognuna di esse, infatti, ha una sua temperatura ottimale alla quale dà la massima resa.

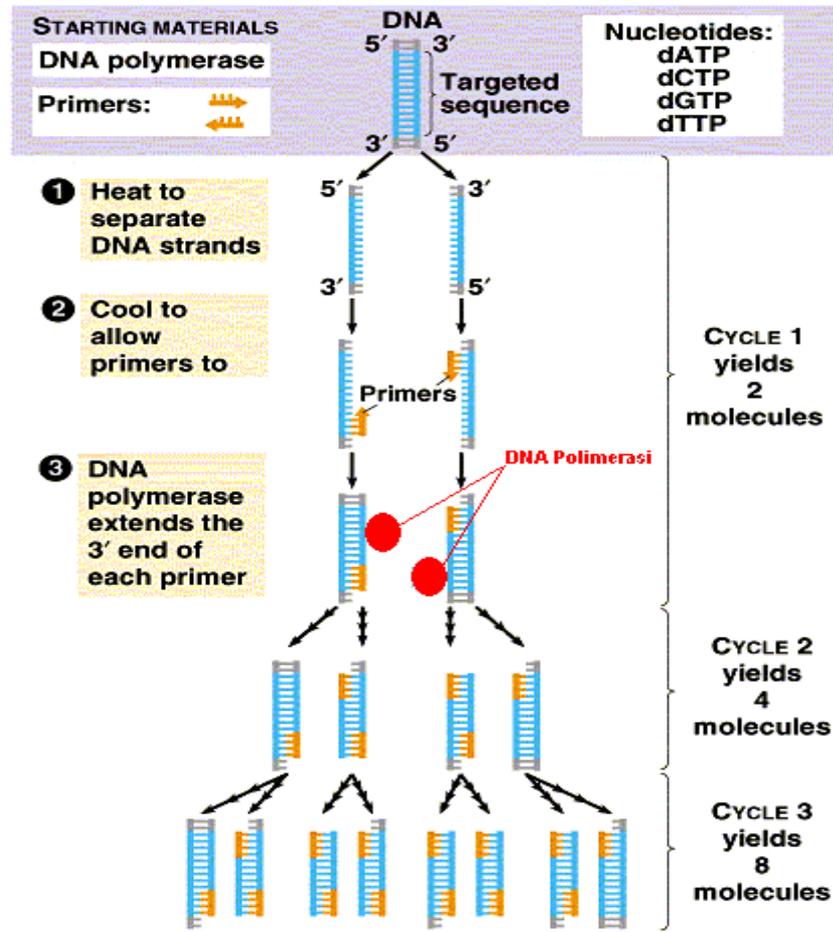


Figura 5.13 Rappresentazione schematica di una reazione di PCR.

La PCR semi-quantitativa consiste in un protocollo di PCR ottimizzato per permettere la quantificazione del prodotto della reazione nella fase in cui esso è direttamente proporzionale alla quantità di partenza dell'mRNA corrispondente al gene in esame. Nella PCR semi-quantitativa la rilevazione della quantità di prodotto è effettuata a un determinato ciclo, stabilito in modo tale che la reazione sia ancora nella fase lineare (Figura 5.14), dove cioè la quantità di amplificato prodotto sia linearmente dipendente dalla quantità di cDNA stampo inizialmente presente nel campione.

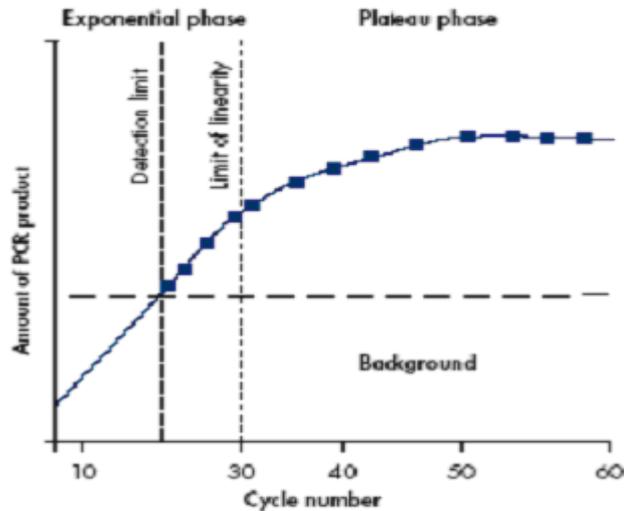


Figura 5.14 Principio della PCR semi-quantitativa.

Nella presente Tesi, inoltre, abbiamo introdotto un'ulteriore modifica del protocollo della PCR semi-quantitativa utilizzando una Taq polimerasi specifica per la messa a punto di protocolli di PCR multipla (*multiplex PCR*), ossia reazioni in cui vengano generati in maniera specifica due o più prodotti di amplificazione simultaneamente. Tale enzima è la AccuPrime Taq (Invitrogen). La miscela di reazione di questo enzima, infatti, è stata ottimizzata introducendo degli anticorpi anti-Taq e delle proteine accessorie. L'anticorpo anti-Taq inibisce l'attività polimerasica al di sotto della temperatura di estensione, in modo tale da ridurre la produzione di amplificati aspecifici nelle fasi di *annealing* o nei passaggi tra le fasi di incubazione a diverse temperature (Chou et al. 1992; Sharkey et al. 1994). Le proteine accessorie, invece, interagiscono sia con il tratto di DNA stampo sia con i *primer* per facilitare durante la fase di *annealing* il legame di quest'ultimi esclusivamente nei tratti a loro perfettamente complementari con il tratto specifico. In questo modo, si otterrà l'amplificazione specifica dei soli frammenti bersaglio, anche in presenza di più coppie di *primers*.

Protocollo sperimentale

La reazione di PCR è stata eseguita utilizzando la seguente coppia di *primer* specifici per il prodotto genico *AChE* (Santos et al 2007):

1. (+), 5'- CGG GTC TAC GCC TAC GTC TTT GAA CAC CGT TC - 3'
2. (-), 5'- CAC AGG TCT GAG CAG CGA TCC TGC TTG CTG - 3'

Nelle cellule di mammifero tutti i trascritti di AChE contengono l'esone 1 (E1), l'esone 2 (E2), l'esone 3 (E3), l'esone 4 (E4) e l'esone 6 (E6), ma non l'esone 5 (E5) che varia in dipendenza dello splicing. In particolare la coppia di primer utilizzata permette di amplificare un frammento del gene pari a 452 pb.

Inoltre, per ogni reazione è stata effettuata la co-amplificazione di un frammento del cDNA corrispondente al gene ribosomiale 18s rRNA. Questo rappresenta un controllo positivo che consente di testare l'accuratezza dei dati. Il controllo positivo 18s è un *gene housekeeping*, ossia un gene la cui espressione non risulta significativamente influenzata dallo status fisiologico delle cellule o dell'organismo in esame (Goidin et al., 2001). I *primers* utilizzati per l'amplificazione di un frammento del gene ribosomiale 18s rRNA sono riportati da Li-ji et al (2005).

La reazione di PCR è stata condotta per ogni campione in un volume finale di 20 μ L così composto:

▪ Buffer 10 X (Invitrogen)	1X
▪ dNTPs (miscela equimolare)	200 μ M
▪ <i>primers</i> per AChE	0.2 μ M ciascuno
▪ <i>primers</i> per 18s	0.2 μ M ciascuno
▪ AccuPrime Taq (Invitrogen)	0.6 unità
▪ cDNA	1 μ L

Le reazioni sono state condotte in un termocicizzatore ONE Gradient (Celbio); dopo una prima fase di denaturazione per 2 minuti a 94 °C sono stati eseguiti 30 cicli termici così composti:

1. 45 secondi a 94 °C (denaturazione);
2. 30 secondi a 55 °C (annealing dei primer);
3. 60 secondi a 68 °C (estensione).

I primer per il gene 18s sono stati aggiunti alla miscela di reazione dopo 20 cicli in modo tale da effettuare solo 10 cicli di amplificazione.

d) Elettroforesi quantitativa su gel d'agarosio

Per la rilevazione dei prodotti genici, i campioni di cDNA amplificati, vengono sottoposti a corsa elettroforetica su *gel d'agarosio*. Questa tecnica consente la separazione del DNA per migrazione delle molecole nella matrice semisolida (gel), sotto l'azione di un

campo elettrico con direzione costante, generato da una differenza di potenziale (ΔV) applicata agli elettrodi di una cella elettrochimica.

Il principio su cui si fonda la separazione elettroforetica, è che la molecola di DNA è carica negativamente per la presenza dei gruppi fosfato legati al carbonio 5' di ogni nucleotide; pertanto il DNA tenderà a migrare verso il polo positivo con una velocità (e quindi una distanza percorsa) dipendente dalla dimensione della molecola stessa, che, assieme alla percentuale di agarosio, influenza la resistenza che la molecola incontra nel migrare attraverso la trama del gel. Per la preparazione del gel, l'agarosio è stato sciolto in una soluzione di TBE (45 mM Tris-Borato, 1 mM EDTA); la soluzione è stata portata ad ebollizione, lasciata raffreddare e addizionata con una soluzione di *gel red* (utilizzato in base al protocollo fornito dal produttore). Questo è un agente intercalante che si lega ai frammenti di DNA a doppio filamento in corrispondenza del solco minore e ne permette la rilevazione mediante esposizione ad una sorgente di raggi UV. Il gel è stato quindi colato in appositi stampi rettangolari provvisti di pettini che, a polimerizzazione completata, hanno prodotto il calco dei pozzetti per il caricamento dei campioni di DNA. Una volta raffreddato, il gel semi-solido da origine ad una trama le cui maglie avranno dimensioni minori all'aumentare della concentrazione dell'agarosio nel gel. Per l'elettroforesi quantitativa è usata una concentrazione di agarosio (Roche) pari al 2.5%.

Al prodotto di PCR da sottoporre ad elettroforesi viene addizionato un tampone di caricamento contenente un tracciante colorato (blu di bromofenolo), che, migrando insieme alle molecole di DNA, consente di seguire visivamente la migrazione nel gel durante la corsa, e un addensante (glicerolo), che permette al campione di scendere all'interno del pozzetto una volta caricato. La composizione chimica del tampone di caricamento è la seguente: blu di bromofenolo 0.25%, glicerolo 30%.

I prodotti di amplificazione addizionati col tampone di caricamento sono alloggiati nei pozzetti appositamente creati nel gel; la vasca elettroforetica viene collegata all'alimentatore e si fa quindi partire la corsa elettroforetica. I parametri sono: 90V (voltage costante) per 30 minuti (Figura 5.15).

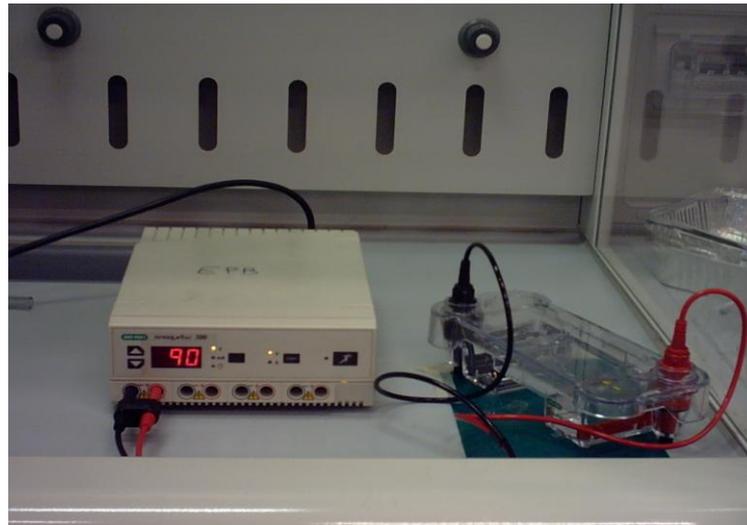


Figura 5.15 Strumentazione necessaria per la corsa elettroforetica.

La visualizzazione delle corse elettroforetiche è stata ottenuta mediante un transilluminatore, strumento che emette raggi UV a 365 nm, interfacciato al sistema di videodocumentazione IMAGEMASTER VDS (Amersham-Pharmacia Biotech). L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata per mezzo del software ImageMaster Total Lab v.100 (Amersham), dopo aver opportunamente acquisito le fotografie al computer. L'analisi di immagine fornisce i valori di intensità di pixel delle bande proteiche, che verranno successivamente elaborate mediante fogli di calcolo.

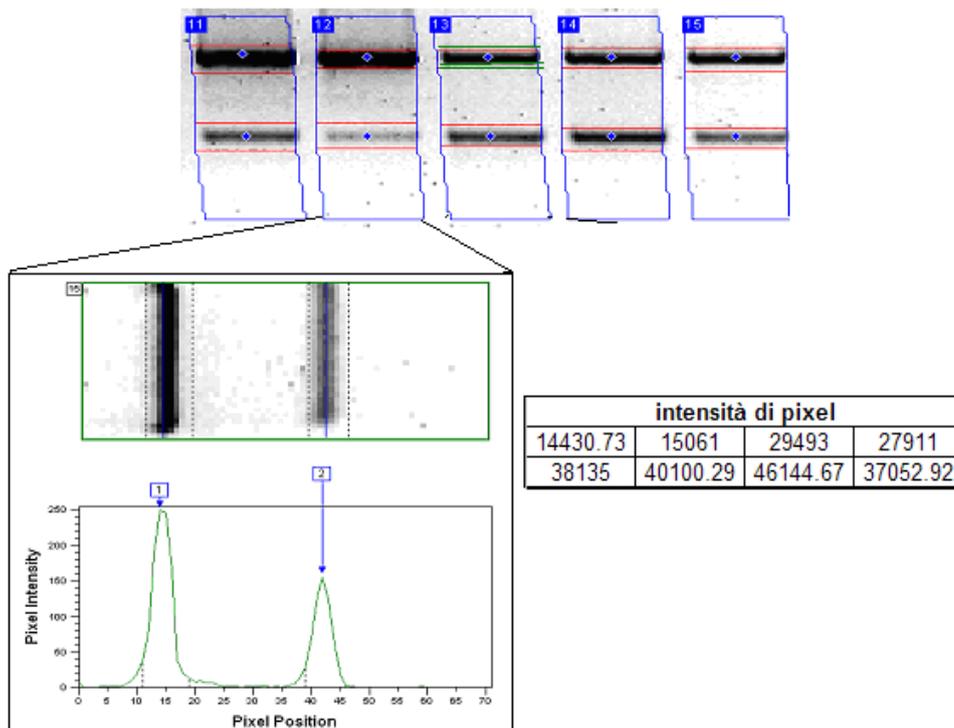


Figura 5.16 Esempio di analisi di immagine effettuata su prodotti genici di AChE e 18s.

5.4 TRATTAMENTO STATISTICO DEI DATI

I dati sono stati espressi come media \pm errore standard dei valori relativi ai rapporti di induzione tra i trattati e i controlli ricavati da almeno 3 esperimenti. La significatività dei risultati è stata valutata mediante ANOVA a 1 via attraverso il programma Sigma Stat (Jandel Scientific); le differenze di ciascun campione rispetto al controllo sperimentale sono state valutate mediante t-test (Sigma Stat). In ogni caso, le differenze sono considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

6. RISULTATI

6.1 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DI AChE IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE A CAMPI ELETTROMAGNETICI AD ALTA FREQUENZA

Le cellule PC12 sono state esposte a campi elettromagnetici ad alta frequenza (1.8 GHz, segnale GSM) mediante il sistema espositivo presentato nel precedente capitolo di questa Tesi. Gli esperimenti sono stati condotti in cieco, cioè senza conoscere quale delle due guide d'onda contenenti le piastre con le cellule venisse irraggiata, in maniera tale da mantenere una buona oggettività in tutte le analisi successive. Inoltre, questo permette di avere a disposizione sia delle cellule irraggiate, che delle cellule di controllo non irraggiate, ma poste nelle stesse condizioni ambientali delle prime. La temperatura interna viene monitorata ed è rimasta costante a 36.64 ± 0.12 °C durante i vari periodi di esposizione per evitare eventuali effetti termici. Gli irraggiamenti sono stati effettuati nelle modalità CW, GSM 217 Hz, GSM Talk, con segnale intermittente 5 min ON/10 min OFF per 4, 16 e 24 ore applicando un SAR costante di 2 W/kg in tutte le modalità di irraggiamento. In seguito ai trattamenti sono state eseguite analisi volte ad esaminare l'attività e la cinetica enzimatica dell'AChE.

6.1.1 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW

Le analisi svolte per rilevare eventuali alterazioni dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito all'esposizione a campi elettromagnetici nella modalità CW hanno evidenziato un aumento significativo dei valori rispetto al controllo solo per il periodo di esposizione di 24 ore, mentre per l'esposizione a 4 e 16 ore non si è riscontrato un aumento significativo dell'attività (Fig. 6.1).

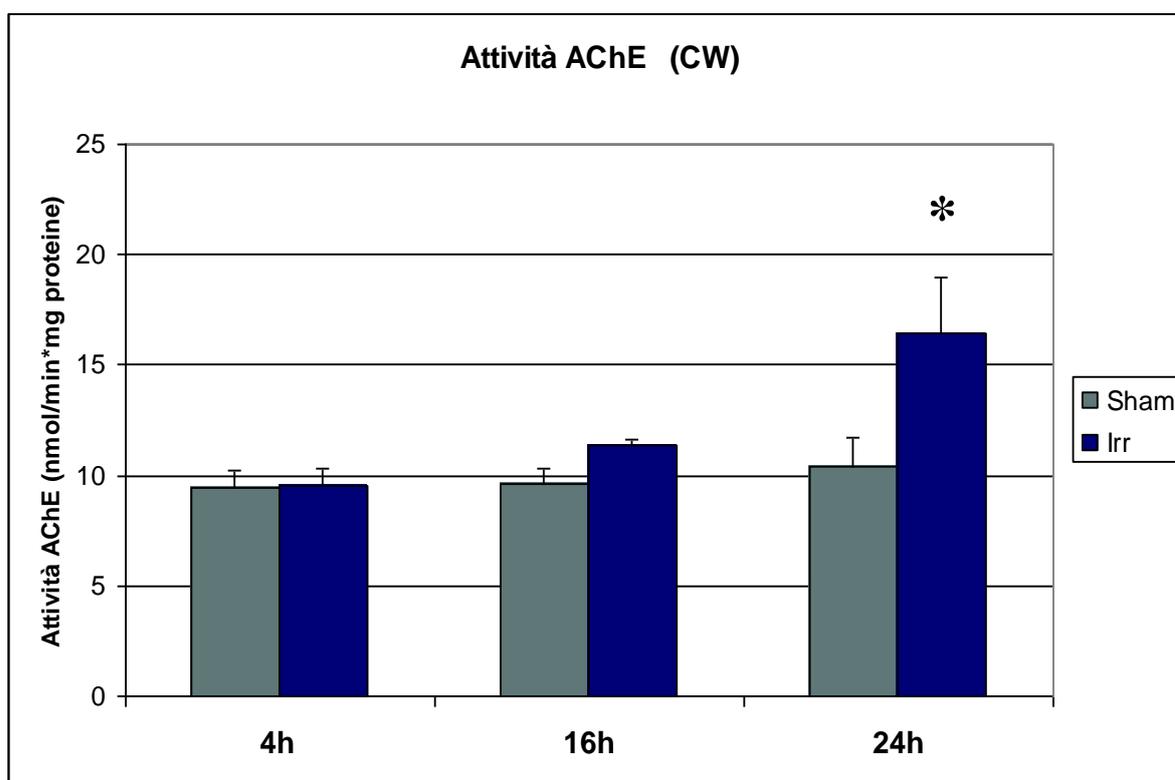


Figura 6.1 Attività dell'enzima AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità CW. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori rappresentano la media di sei esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso da sham; $P < 0.05$).

6.1.2 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz

Le analisi svolte per rilevare eventuali alterazioni dell'attività enzimatica dell'AChE in seguito all'esposizione a campi elettromagnetici con modulazione di impulso a 217 Hz, hanno evidenziato anche in questo caso un aumento significativo rispetto al controllo solo per il periodo di esposizione di 24 ore, mentre per l'esposizione a 4 e 16 ore non si è riscontrato un aumento significativo dell'attività (Fig. 6.2).

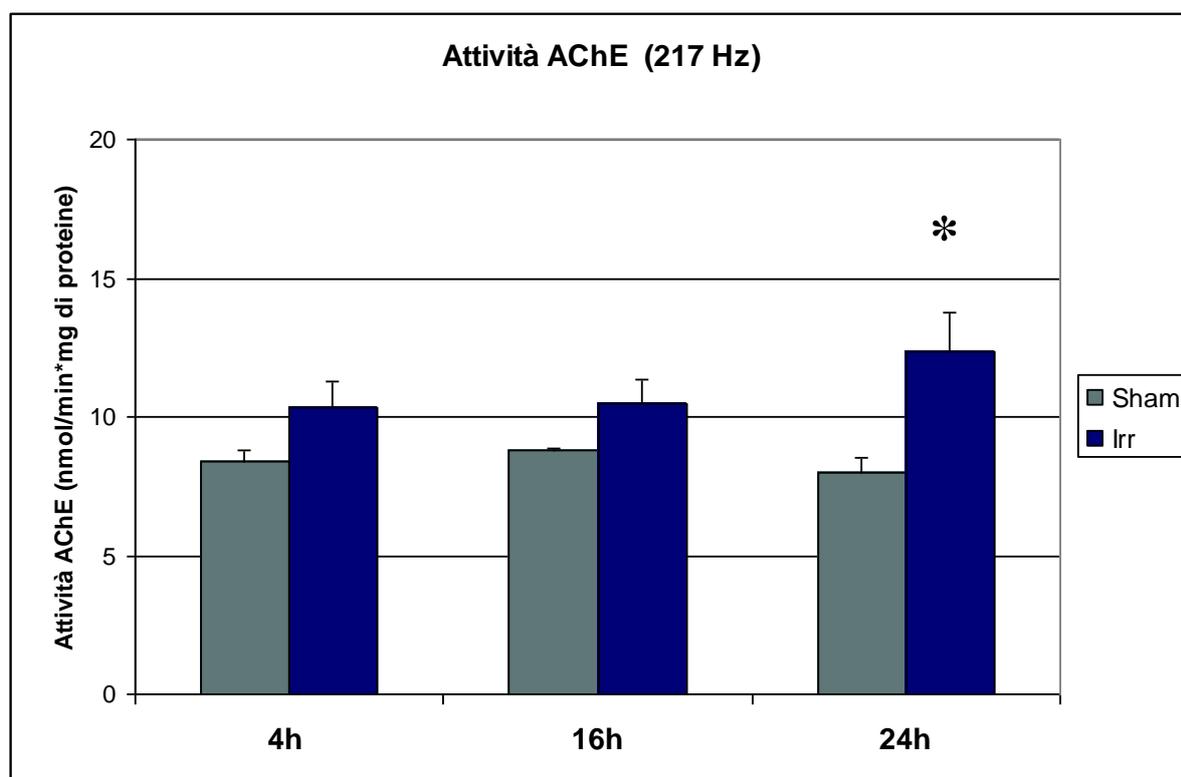


Figura 6.2 Attività dell'enzima AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità GSM 217 Hz. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori rappresentano la media di sei esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso da sham; $P < 0.05$).

6.1.3 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk

Infine sono state svolte analisi per valutare l'andamento dell'attività dell'AChE in cellule esposte al segnale Talk. Questo tipo di segnale permette di simulare quello che avviene durante una tipica conversazione telefonica in continuo (34% di parlato e 66% di ascolto). Le analisi svolte per rilevare eventuali alterazioni dell'attività enzimatica dell'AChE hanno evidenziato anche in questo caso un aumento significativo dei valori rispetto al controllo solo per il periodo di esposizione di 24 ore, mentre per l'esposizione a 4 e 16 ore non si è riscontrato un aumento significativo dell'attività (Fig. 6.3).

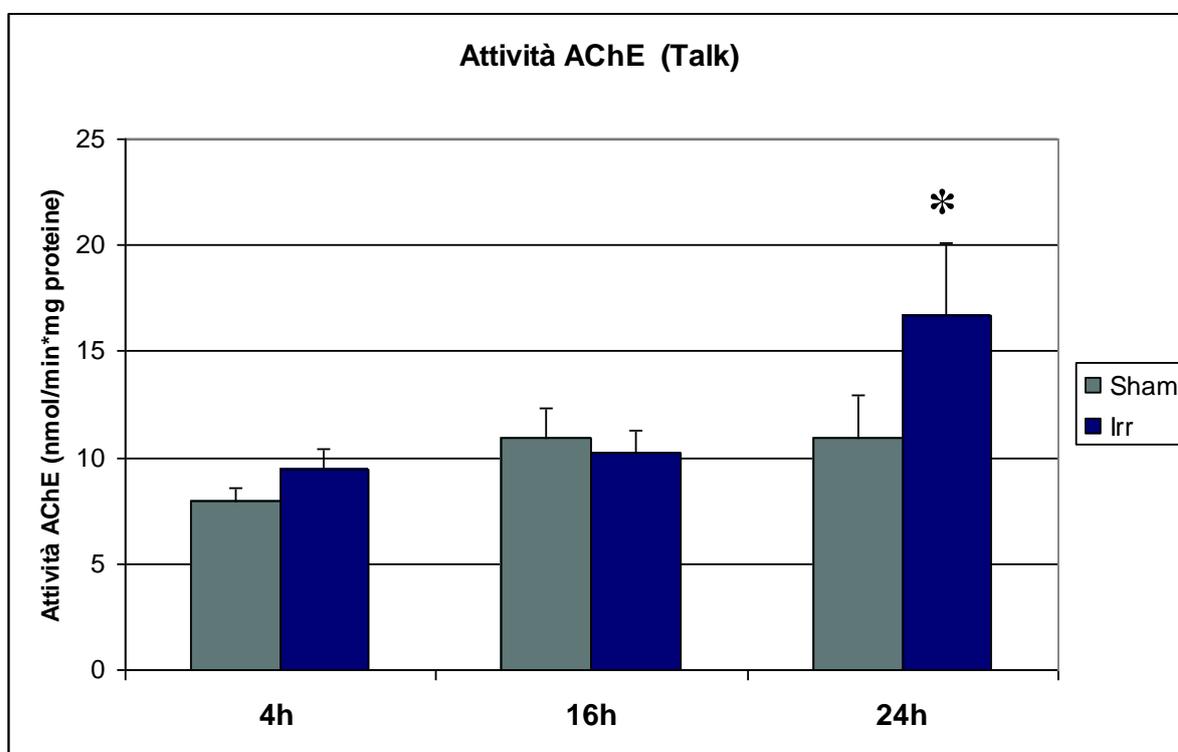


Figura 6.3 Attività dell'enzima AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità GSM Talk. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori rappresentano la media di sei esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso da sham; $P < 0.05$).

6.1.4 Valutazione della cinetica enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW

In seguito all'analisi dell'attività enzimatica dell'AChE, è stata studiata la cinetica dell'enzima esponendo le cellule alla modalità di irraggiamento CW per 24 ore. Dopo l'esposizione è stata valutata mediante saggio enzimatico (Ellman) la velocità di reazione dell'AChE in presenza di concentrazioni crescenti (0.001 mM a 6 mM) di substrato ASCh. Questo è stato fatto per vedere come cambiava l'attività dell'AChE fornendo diverse concentrazioni di substrato, in modo da poter costruire una curva della cinetica enzimatica (*velocità vs concentrazione di substrato*) sia di campioni esposti a campi elettromagnetici che di campioni di controllo, e ricavare le grandezze caratteristiche V_{max} e K_m . La cinetica ha mostrato un aumento significativo della V_{max} nei campioni irraggiati rispetto ai campioni di controllo (mentre la K_m rimaneva costante), come viene rappresentato in figura 6.4.

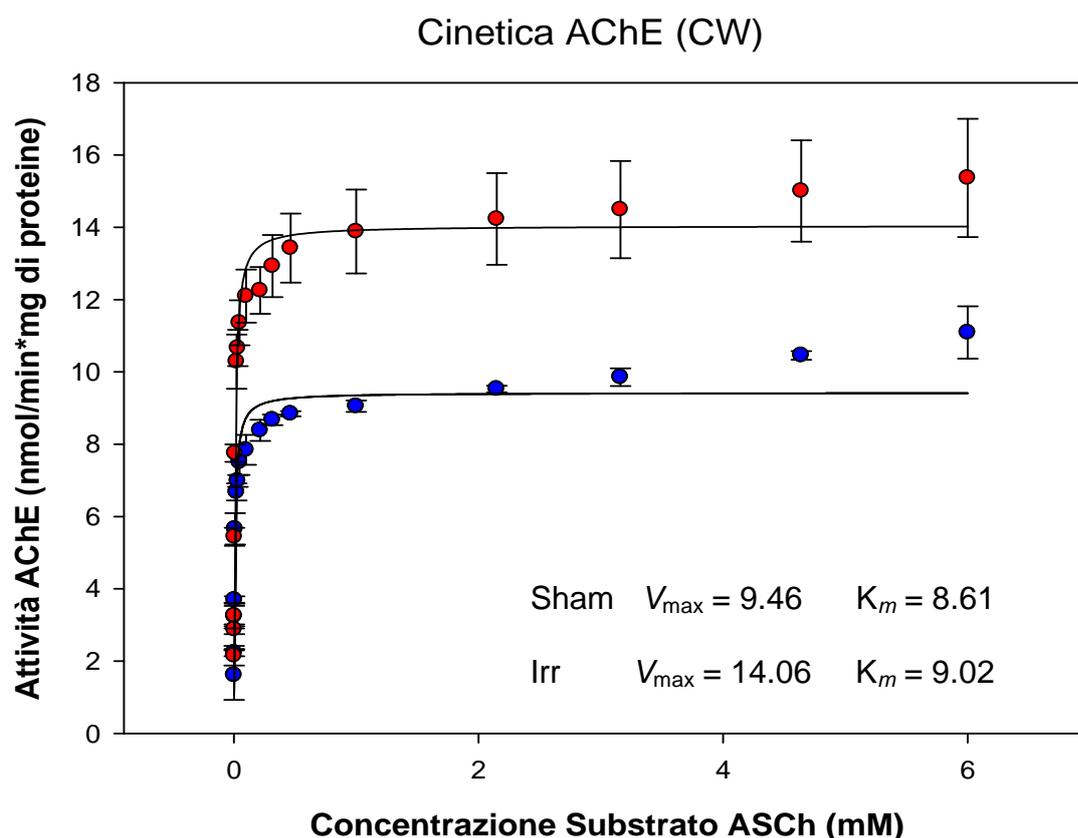


Figura 6.4 Cinetica dell'AChE espressa come velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato ASCh (acetiltiocolina). I pallini azzurri (●) rappresentano i valori del controllo (sham); i pallini rossi (●) rappresentano i valori dei campioni esposti ad irraggiamento in modalità CW. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. Le barre di errore rappresentano l'errore standard (n = 6). I risultati dell'analisi statistica dei dati sono riportati nella tabella 11.

6.1.5 Valutazione della cinetica enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz

E' stata valutata la cinetica dell'enzima AChE esponendo le cellule a campi elettromagnetici con modulazione di impulso a 217 Hz per 24 ore. Anche in questo caso è stato riscontrato un aumento significativo della V_{max} (K_m costante) rispetto ai campioni di controllo (Fig 6.5).

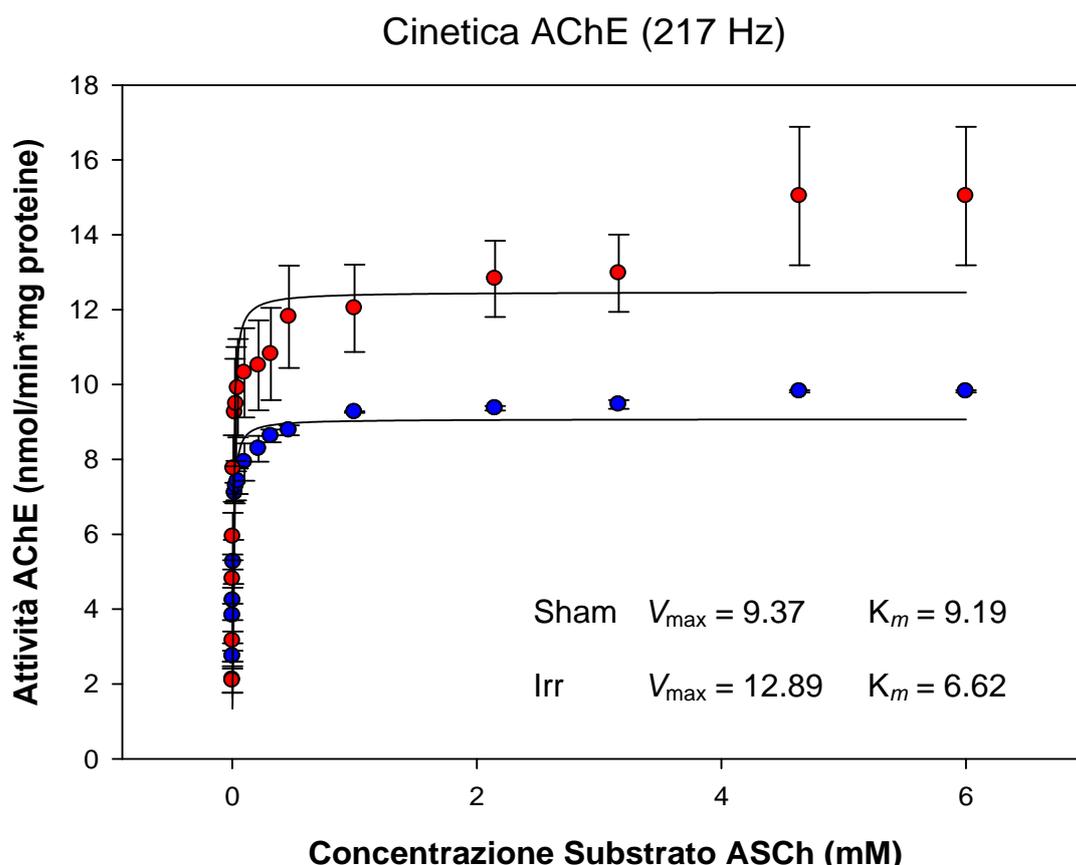


Figura 6.5 Cinetica dell'AChE espressa come velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato ASCh (acetiltiocolina). I pallini azzurri (●) rappresentano i valori del controllo; i pallini rossi (●) rappresentano i valori dei campioni esposti ad irraggiamento nella modalità GSM 217 Hz. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. Le barre di errore rappresentano l'errore standard (n = 6). I risultati dell'analisi statistica dei dati sono riportati nella tabella 11.

6.1.6 Valutazione della cinetica enzimatica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk

Per chiudere il quadro sulla valutazione della cinetica enzimatica le cellule sono state esposte a campi elettromagnetici nella modalità Talk per 24 ore, la quale riproduce il segnale che si genera in una tipica conversazione telefonica. La cinetica ha mostrato anche in questo caso un aumento significativo della V_{max} (ed una K_m costante) nei campioni irraggiati rispetto ai campioni di controllo (fig 6.6).

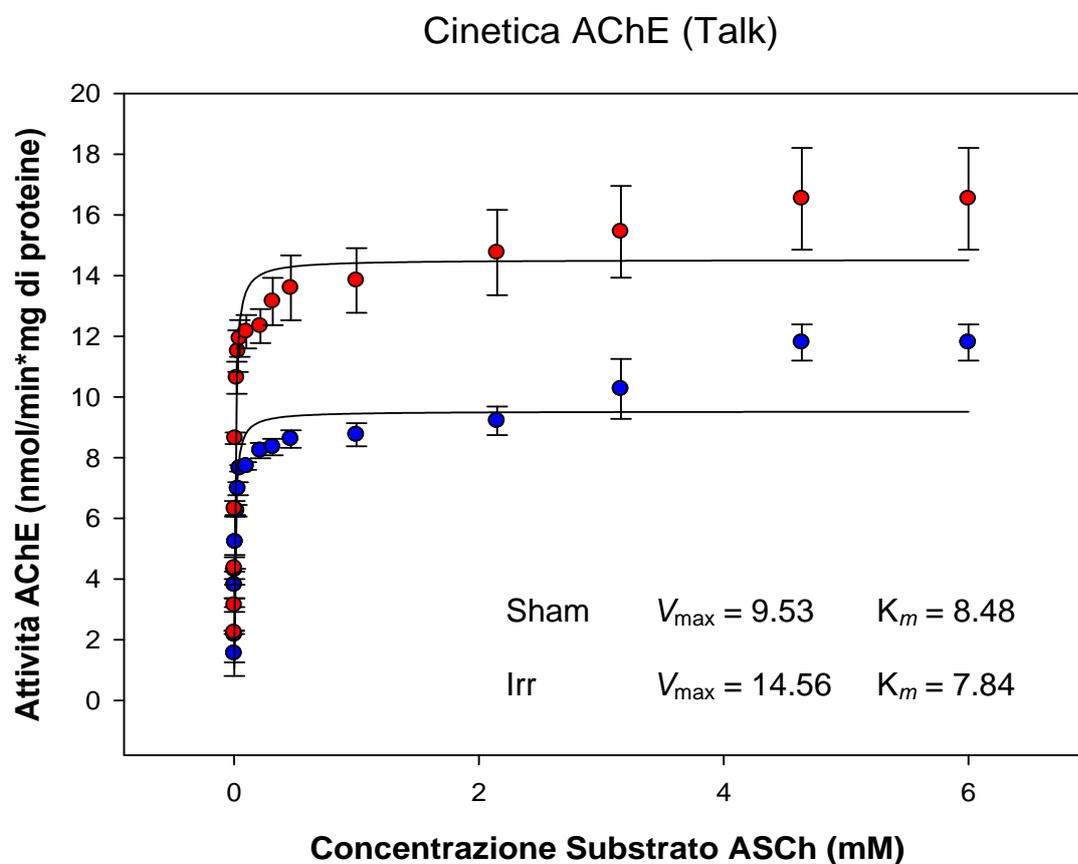


Figura 6.6 Cinetica dell'AChE espressa come velocità di reazione in funzione della concentrazione del substrato ASCh (acetiltilocolina). I pallini azzurri (●) rappresentano i valori del controllo; i pallini rossi (●) rappresentano i valori dei campioni esposti ad irraggiamento in modalità GSM Talk. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. Le barre di errore rappresentano l'errore standard. (n = 6). I risultati dell'analisi statistica dei dati sono riportati nella tabella 11.

La tabella 11 riassume i valori di V_{max} e K_m dell'AChE con i rispettivi errori standard in seguito ad esposizione delle cellule PC12 ad irraggiamento nelle modalità CW, GSM 217 Hz e GSM Talk:

Tabella 11. Schema riassuntivo dei valori di V_{max} e K_m dell'AChE e rispettivi errori standard in seguito ad esposizione delle cellule PC12 ad irraggiamento nelle modalità CW, GSM 217 Hz e GSM Talk.

	V_{max} (nmol/min/mg prot)			K_m (μ M)		
	sham	irr	ctrl	sham	irr	ctrl
CW	9,46	14,06 *	9,80	8,61	9,02	8,74
es	0,06	1,14	0,17	0,88	1,00	1,14
GSM 217 Hz	9,37	12,89 *	9,49	9,19	6,62	5,53
es	0,07	0,96	0,17	2,08	1,48	0,55
GSM Talk	9,53	14,56 *	9,55	8,48	7,84	9,99
es	0,34	1,18	0,16	2,28	1,25	4,45

* = statisticamente significativo rispetto allo sham. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. Ctrl = campione mantenuto in analogo incubatore non contenente la strumentazione per l'irraggiamento.

6.2 VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA AChE IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON FORSKOLIN

Lo scopo di questa fase preliminare allo studio dell'espressione dell'AChE in cellule esposte a campi elettromagnetici, è quello di valutare la capacità da parte dell'enzima di rispondere ad un attivatore dell'adenilato-ciclastasi che stimola il segnale AMP-ciclico dipendente e provoca un effetto sull'attività e l'espressione dell'AChE. Questo lavoro è servito per valutare la risposta delle cellule PC12 ad un composto con effetto noto sull'AChE, e inoltre per accertare che i metodi di analisi utilizzati riuscissero a caratterizzare bene la risposta ottenuta. I campioni stimolati con forskolin rappresentano quindi il controllo positivo di riferimento per i successivi esperimenti di esposizione ai campi elettromagnetici.

A questo scopo si è scelto di trattare le cellule PC12 con una soluzione di *forskolin* 10 µM, una sostanza attivatrice del segnale AMP-ciclico dipendente, che viene spesso utilizzata in studi di fisiologia cellulare.

In seguito sono state svolte analisi per determinare:

- l'attività enzimatica dell'AChE in seguito al trattamento con forskolin;
- l'espressione proteica dell'AChE;
- l'espressione genica dell'AChE.

6.2.1 Valutazione dell'attività enzimatica di AChE

Le cellule PC12 sono state trattate per 48 h con una soluzione di forskolin 10 μ M. In seguito è stata svolta l'analisi enzimatica per la valutazione dell'attività dell'enzima nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate. Le analisi svolte per rilevare eventuali alterazioni dell'attività enzimatica hanno evidenziato che l'AChE risponde molto bene al trattamento con forskolin, mostrando un aumento significativo valutato rispetto al campione di controllo (non trattato) pari a 4.04 volte (Fig 6.7).

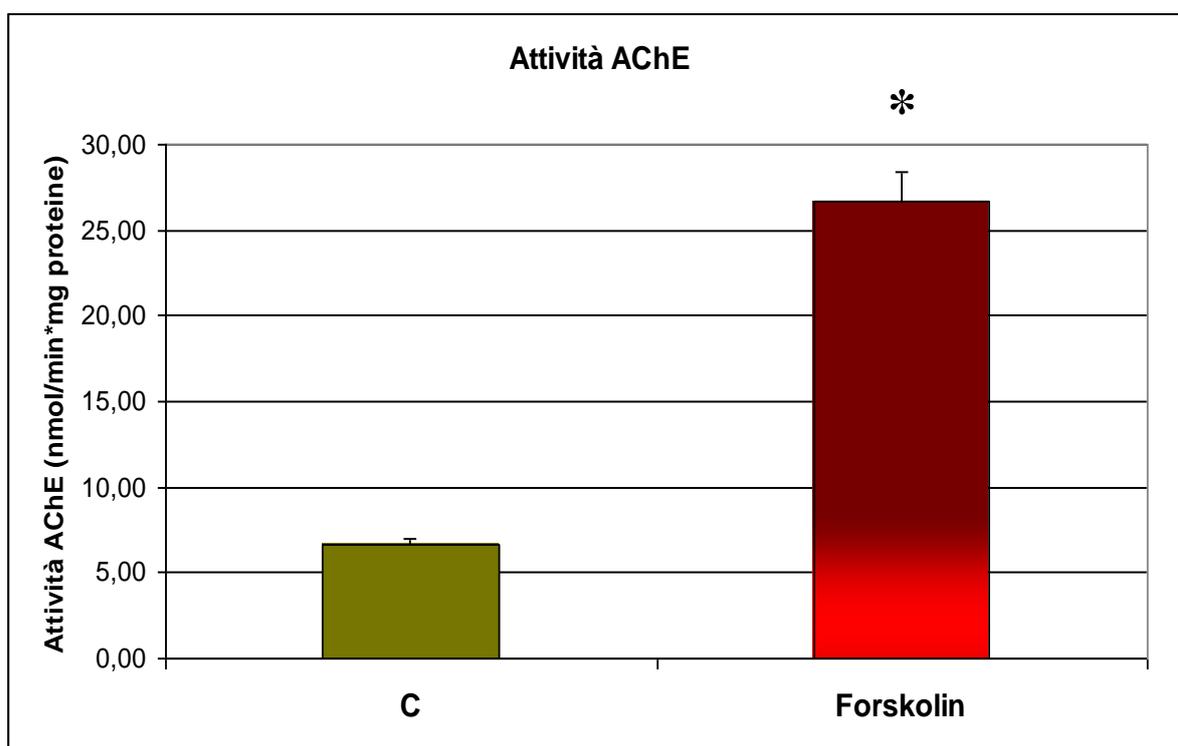


Figura 6.7 Attività enzimatica dell'AChE in seguito ad esposizione a forskolin per 48 h. I valori derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso da sham; $P < 0.05$).

6.2.2 Valutazione dell'espressione proteica di AChE

Dopo aver valutato l'attività enzimatica dell'AChE di cellule trattate con forskolin, si è voluto vedere se l'attivazione dell'enzima, valutata mediante saggio enzimatico, si potesse riscontrare anche nell'espressione proteica. Le cellule PC12 sono state trattate per 48 h con una soluzione di forskolin 10 μ M ed in seguito è stata valutata l'espressione proteica mediante Western Blotting. Le analisi hanno evidenziato un aumento significativo dell'espressione proteica dell'AChE rispetto ai campioni di controllo, con un'attivazione di 4.13 volte (Fig. 6.8 A e B).

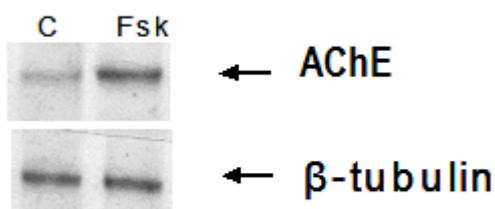


Figura 6.8 A. Immagine rappresentativa dell'espressione dell'enzima AChE valutata mediante Western Blotting. L'espressione della β -tubulina è utilizzata in parallelo per garantire un identico caricamento del campione in esame nei diversi pozzetti elettroforetici.

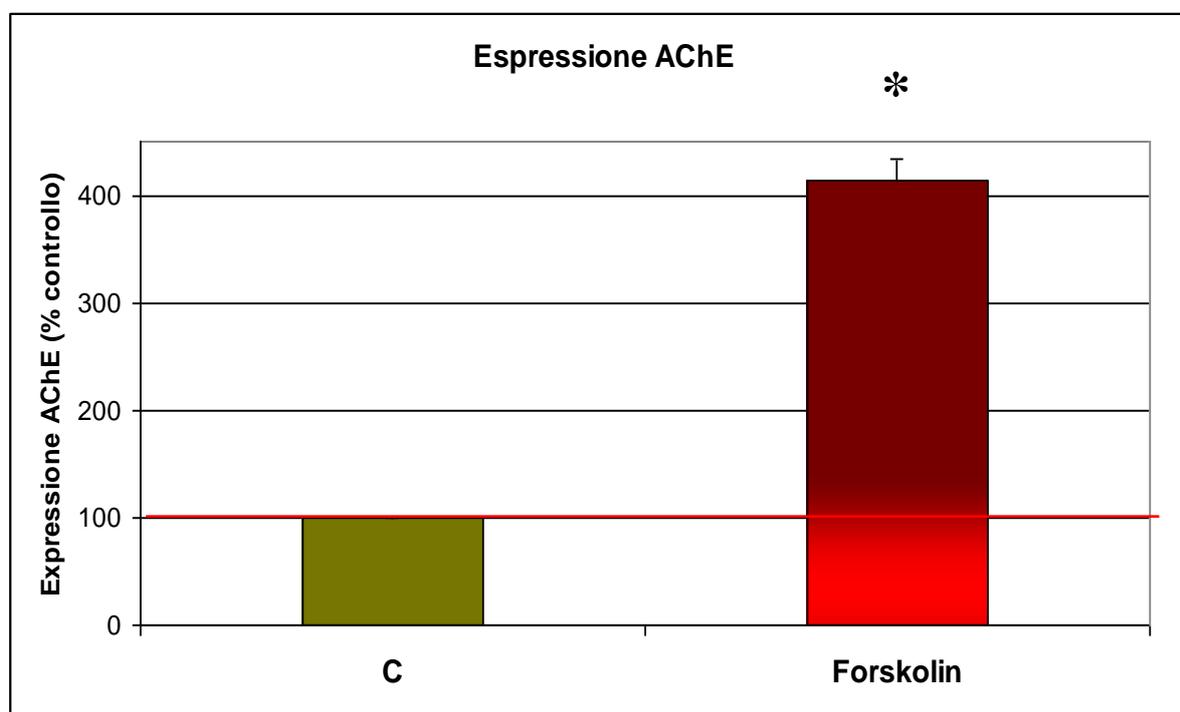


Figura 6.8 B. Espressione proteica dell'AChE in seguito ad esposizione a forskolin per 48 h. I valori sono espressi come % rispetto al controllo e derivano dalla media di tre esperimenti diversi; le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso da sham; $P < 0.05$).

6.2.3 Valutazione dell'espressione genica di AChE

Al fine di avere un quadro più organico del sistema in esame è stata valutata anche l'espressione genica dell'AChE. Le cellule PC12 sono state trattate per 48 h con una soluzione di forskolin 10 μ M, in seguito è stato estratto l'RNA, retrotrascritto e amplificato mediante PCR multiplex semiquantitativa. Questo ha permesso di analizzare il comportamento e le eventuali variazioni dei livelli genici dell'AChE; in particolare le analisi hanno evidenziato un aumento significativo dell'espressione genica dell'AChE con un'attivazione di 4.11 volte (Fig. 6.9 A e B).

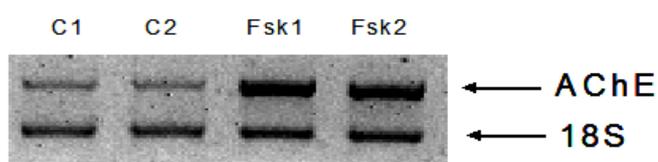


Figura 6.9 A. Immagine rappresentativa delle bande relative all'espressione del trascritto AChE ottenute per elettroforesi. L'espressione del 18s è valutata in parallelo come riferimento.

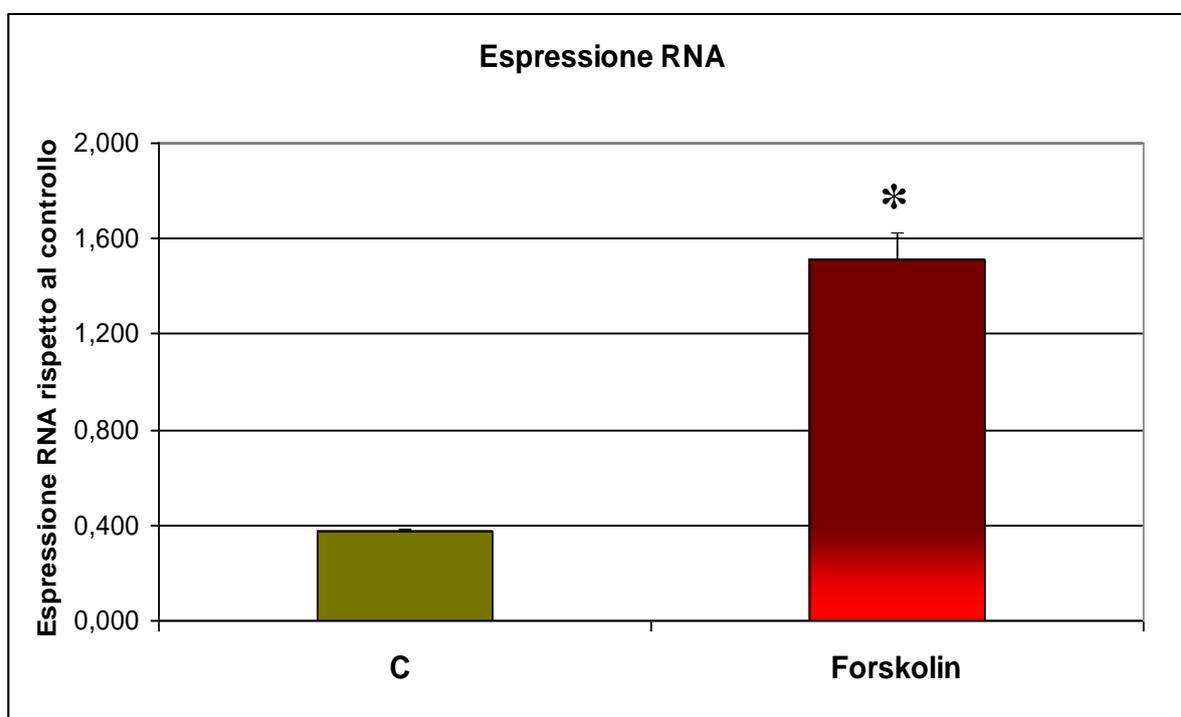


Figura 6.9 B. Espressione genica dell'AChE in seguito ad esposizione a forskolin per 48 h. I valori espressi sono normalizzati rispetto al controllo positivo 18s rRNA e derivano dalla media di tre esperimenti diversi; le barre di errore riportano l'errore standard (*significativamente diverso da sham; $P < 0.05$).

6.3 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE PROTEICA DI AChE

6.3.1 Valutazione dell'espressione proteica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW

Le cellule sono state esposte ad irraggiamento nella modalità CW per 4, 16 e 24 ore ed in seguito è stata valutata mediante Western Blotting l'espressione dei livelli di AChE. In figura 6.10 è riportata una foto rappresentativa delle bande proteiche visualizzate mediante chemiluminescenza. Dalle analisi non si è riscontrato alcun aumento o riduzione significativa dell'espressione proteica per alcun periodo di esposizione (fig. 6.10 A e B).

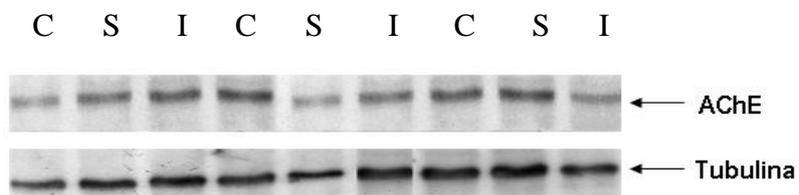


Figura 6.10 A. Foto rappresentativa delle bande proteiche visualizzate mediante chemiluminescenza derivante da Western Blotting eseguito su cellule irraggiate con campi elettromagnetici ad alta frequenza. C = controllo; S = Sham; I = Irraggiato.

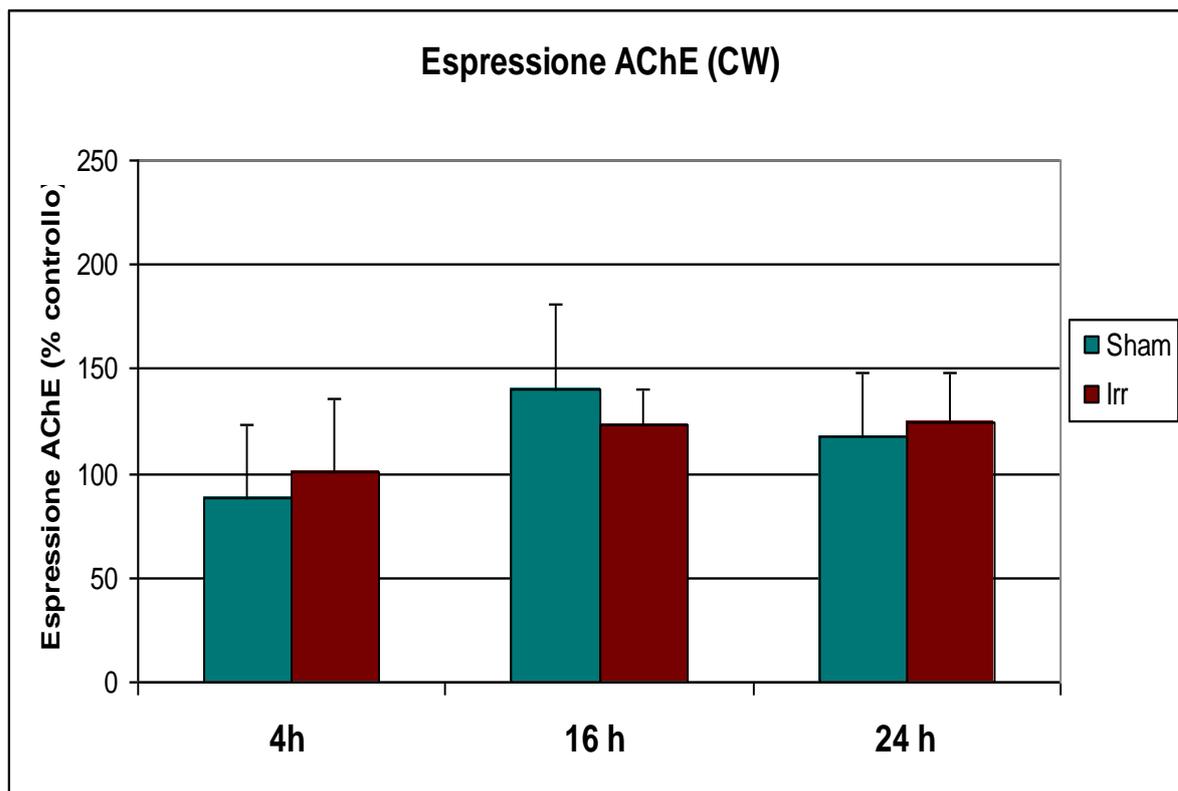


Figura 6.10 B. Espressione della proteina AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità CW (continuous wavelenght) saggiata mediante Western blotting. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori sono espressi in percentuale rispetto ad un controllo esterno non irraggiato e derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti. .

6.3.2 Valutazione dell'espressione proteica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz

Le cellule sono state esposte per 4, 16 e 24 ore a campi elettromagnetici con frequenza pari a 1.8 GHz e modulazione di impulso a 217 Hz. In seguito sono stati valutati i livelli di espressione proteica dell'AChE nei campioni esposti rispetto ai campioni di controllo. Le analisi non hanno evidenziato alcun aumento o riduzione significativa dell'espressione proteica di AChE per alcun periodo espositivo (fig. 6.11).

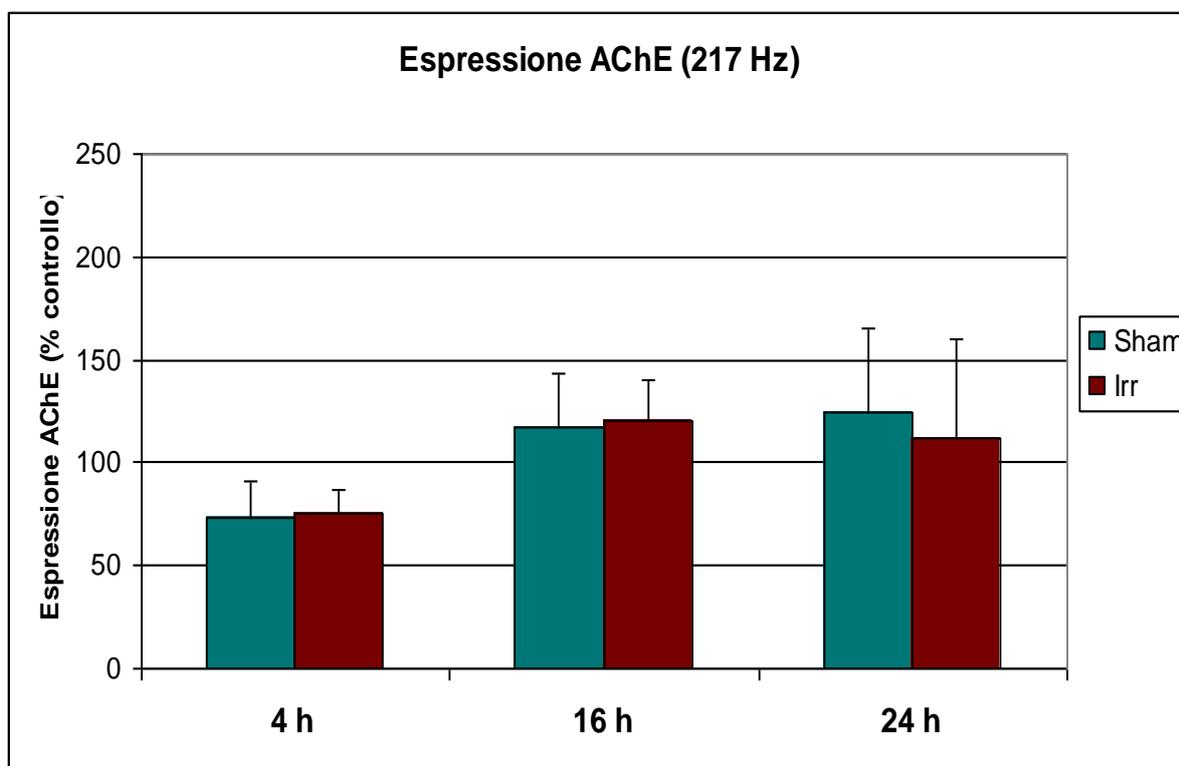


Figura 6.11 Espressione della proteina AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità GSM 217 Hz saggiata mediante Western blotting. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori sono espressi in percentuale rispetto ad un controllo esterno non irraggiato e derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti. .

6.3.3 Valutazione dell'espressione proteica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk

Le cellule sono state esposte per 4, 16 e 24 ore a campi elettromagnetici con frequenza pari a 1.8 GHz nella modalità Talk, che simula i segnali prodotti da una tipica conversazione telefonica. In seguito sono stati valutati i livelli di espressione proteica dell'AChE nei campioni esposti rispetto ai campioni di controllo. Le analisi non hanno evidenziato alcun aumento o riduzione significativa dell'espressione proteica di AChE per alcun periodo espositivo (fig. 6.12).

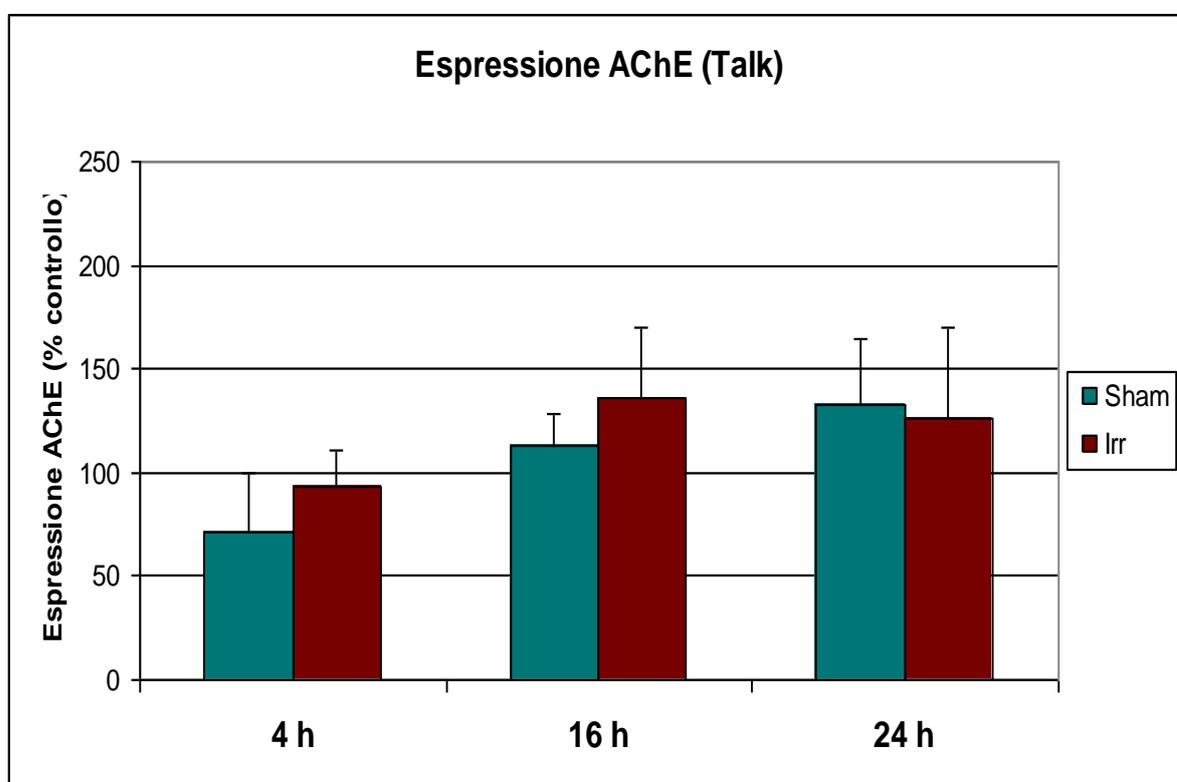


Figura 6.12 Espressione dell'AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità GSM Talk. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori sono espressi in percentuale rispetto ad un controllo esterno non irraggiato e derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti; le barre di errore riportano l'errore standard.

6.4 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI AChE

6.4.1 Valutazione dell'espressione genica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità CW

Successivamente all'analisi dell'espressione proteica dell'AChE, sono stati effettuati degli irraggiamenti nelle tre modalità per valutare eventuali variazioni nei livelli di espressione genica dell'AChE. Le cellule PC12 sono state esposte per 4, 16 e 24 ore a campi elettromagnetici alla frequenza di 1.8 GHz in modalità CW. In seguito è stato estratto l'mRNA, retrotrascritto e amplificato mediante PCR multiplex semiquantitativa utilizzando primers specifici. L'analisi dell'espressione genica non ha mostrato aumenti o riduzioni significative dei livelli genici di AChE nei campioni irraggiati rispetto a quelli non irraggiati in alcun periodo di esposizione (fig 6.13).

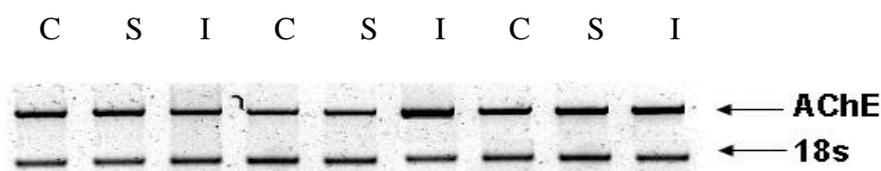


Figura 6.13 Foto di un gel rappresentativo derivante da PCR eseguito su cellule irraggiate con campi elettromagnetici ad alta frequenza. C = controllo; S = Sham; I = Irraggiato.

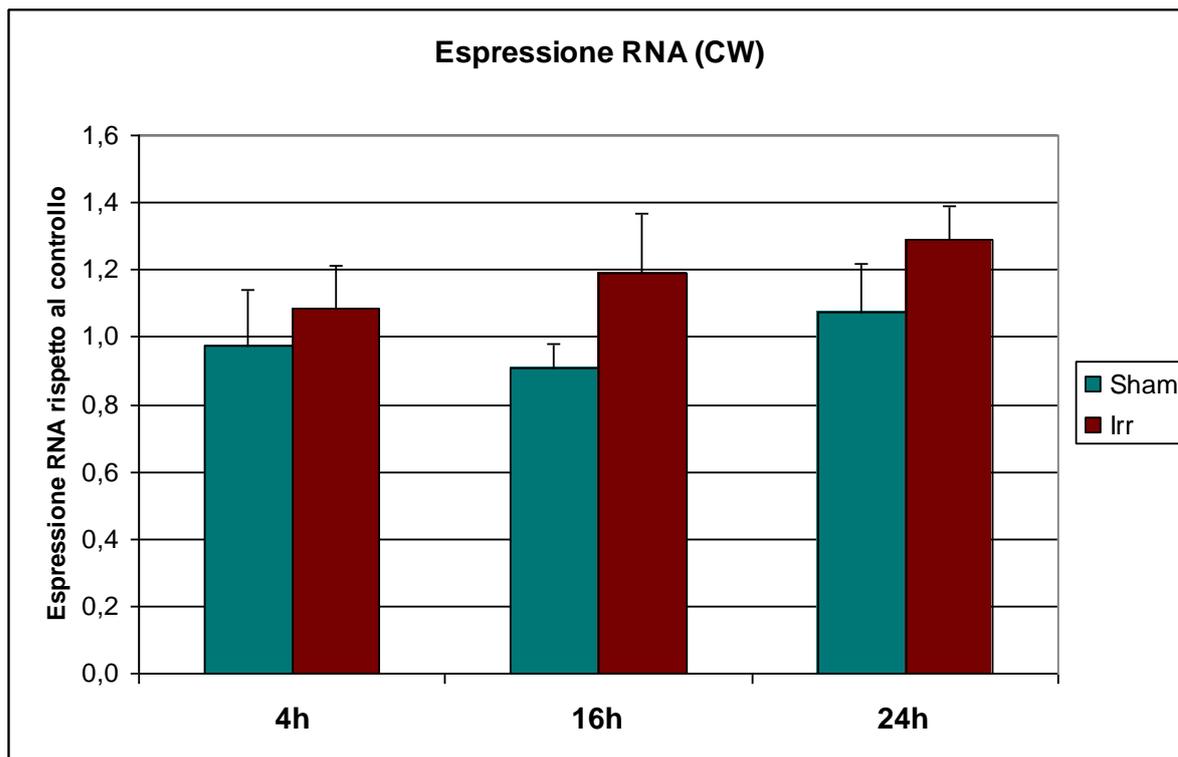


Figura 6.13 Espressione del prodotto genico AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità CW (continuous wavelenght). Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori sono normalizzati rispetto al 18s rRNA, valutati rispetto ad un controllo esterno non irraggiato a cui è stato attribuito valore unitario e derivano dalla media di tre esperimenti diversi; le barre di errore riportano l'errore standard.

6.4.2 Valutazione dell'espressione genica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM 217 Hz

Le cellule PC12 sono state esposte per 4, 16 e 24 ore a campi elettromagnetici alla frequenza di 1.8 GHz con modulazione di impulso a 217 Hz. In seguito è stato estratto l'mRNA, retrotrascritto e amplificato mediante PCR multiplex semiquantitativa utilizzando primers specifici. L'analisi dell'espressione genica non ha mostrato aumenti o riduzioni significative dei livelli genici di AChE nei campioni irraggiati rispetto a quelli non irraggiati in alcun periodo di esposizione (fig 6.14).

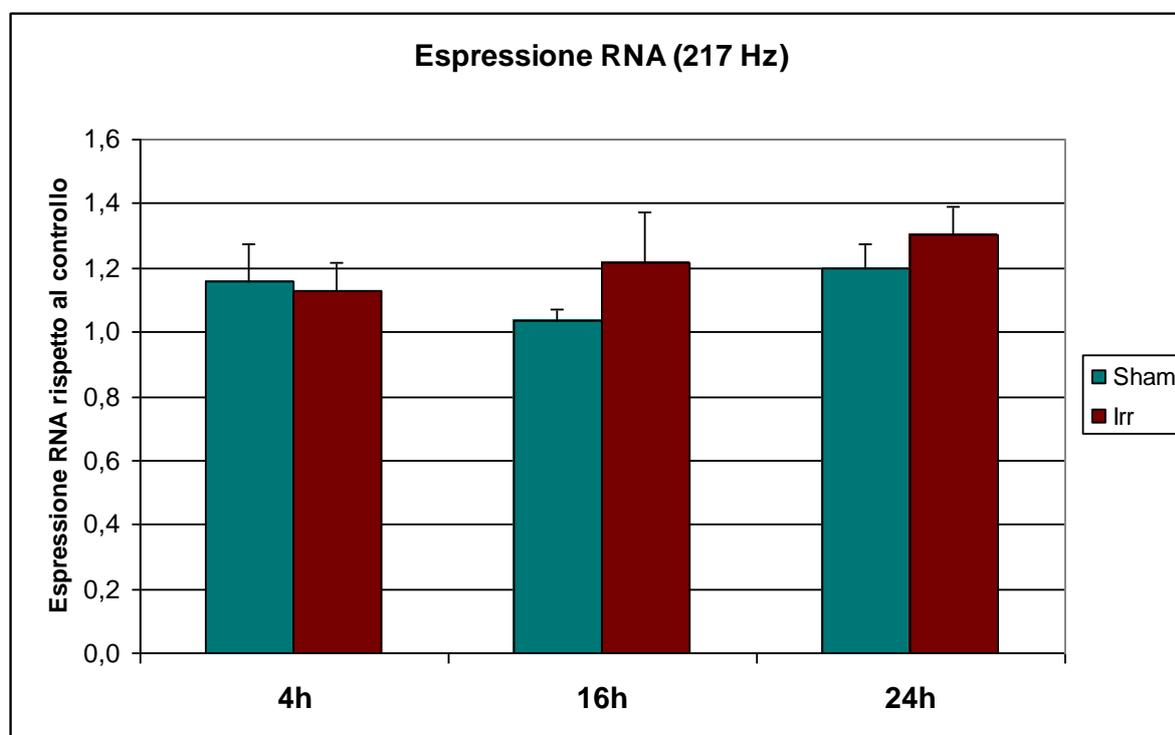


Figura 6.14 Espressione del prodotto genico AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità GSM 217 Hz. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori sono normalizzati rispetto al 18s rRNA, valutati rispetto ad un controllo esterno non irraggiato a cui è stato attribuito valore unitario e derivano dalla media di tre esperimenti diversi; le barre di errore riportano l'errore standard.

6.4.3 Valutazione dell'espressione genica di AChE in cellule esposte a CEM con frequenza pari a 1.8 GHz in modalità GSM Talk

Le cellule PC12 sono state esposte per 4, 16 e 24 ore a campi elettromagnetici alla frequenza di 1.8 GHz in modalità Talk, al fine di simulare il segnale tipico prodotto in una conversazione telefonica. In seguito è stato estratto l'mRNA, retrotrascritto e amplificato mediante PCR multiplex semiquantitativa utilizzando primers specifici. L'analisi dell'espressione genica non ha mostrato aumenti o riduzioni significative dei livelli genici di AChE nei campioni irraggiati rispetto a quelli non irraggiati in alcun periodo di esposizione (fig 6.15).

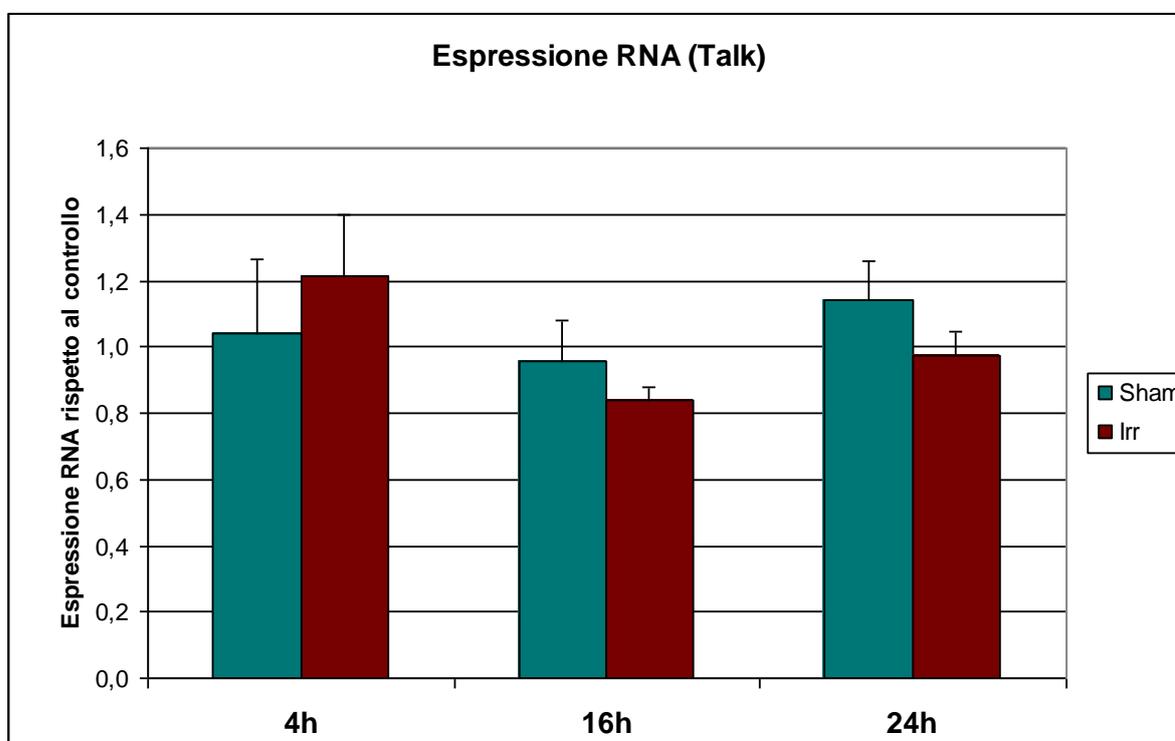


Figura 6.15 Espressione del prodotto genico AChE in campioni irraggiati per 4, 16 e 24 ore con CEM alla frequenza di 1.8 GHz nella modalità GSM Talk. Sham = campione mantenuto all'interno delle guide d'onda ma non esposto ad irraggiamento; Irr = campione esposto ad irraggiamento. I valori sono normalizzati rispetto al 18s rRNA, valutati rispetto ad un controllo esterno non irraggiato a cui è stato attribuito valore unitario e derivano dalla media di tre esperimenti diversi; le barre di errore riportano l'errore standard.

7. DISCUSSIONE

L'incremento vertiginoso nell'utilizzo di apparecchiature elettriche sia nella vita quotidiana che negli ambienti di lavoro, ha provocato un aumento considerevole dei campi elettromagnetici di origine antropica nell'ambiente in cui viviamo. Quello che comunemente viene definito "*inquinamento elettromagnetico*" ha iniziato a destare sempre più preoccupazioni nell'opinione pubblica. I temi più discussi vertono su quali siano i possibili effetti sull'uomo e su come i campi elettromagnetici possano provocare effetti a lungo termine come il cancro o patologie degenerative del sistema nervoso, legate alle interazioni con i sistemi biologici degli organismi.

La ricerca scientifica si muove ormai da anni nello studio dei potenziali effetti biologici e sanitari dei campi elettromagnetici, ma il cammino è risultato difficile in quanto i sistemi di esposizione ai campi non sempre sono di facile reperibilità e i modelli biologici su cui effettuare gli studi possono essere più o meno sensibili a interazioni di questo tipo. Questo ha generato una letteratura internazionale di svariato tipo, fondata su sistemi espositivi diversi, campi elettromagnetici di diversa natura, modelli di studio differenti e target biologici di tutti i tipi. Se da un lato ciò ha contribuito a produrre un'ampia mole di studi su questo argomento (paradossalmente sono presenti più studi sugli effetti da campi elettromagnetici che da sostanze chimiche), dall'altro ha prodotto risultati controversi e spesso di difficile interpretazione. L'assenza di risultati certi e replicabili ha generato sempre più incertezze ed è per questo che la ricerca scientifica continua a lavorare ai fini di una migliore conoscenza di tali problematiche.

L'oggetto di questo studio è stato la valutazione dei possibili effetti biologici 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 *acetilcolinesterasi (AChE)*, di cui è stata valutata la cinetica enzimatica, l'espressione proteica e l'espressione genica.

La scelta del modello cellulare delle PC12 è nata dal fatto che questa linea cellulare, clonata ormai da circa 40 anni, è un utile modello per studi di neurobiologia o per studi rivolti alla conoscenza dei possibili effetti delle alterazioni nelle funzioni neuronali degli organismi. Infatti, le PC12 sono cellule di feocromocitoma di ratto, un tumore che si origina dalla midollare del surrene dei mammiferi, caratterizzate dalla presenza di molte similitudini con le cellule neuronali che costituiscono il sistema nervoso degli organismi. In particolare, queste cellule hanno la capacità di secernere sia il neurotrasmettitore

acetilcolina, che l'enzima deputato alla sua degradazione, ossia l'acetilcolinesterasi. Questo le rende un buon modello per studiare i meccanismi alla base delle funzioni colinergiche e le conseguenze delle possibili alterazioni di queste funzioni derivanti dall'esposizione a campi elettromagnetici ad alta frequenza. In particolare, la valutazione delle risposte fornite dall'enzima acetilcolinesterasi in seguito all'esposizione delle PC12 a campi elettromagnetici, può essere un buon indicatore dei meccanismi biofisici alla base delle interazioni molecolari che caratterizzano i possibili effetti da campi. Dal punto di vista fisiopatologico, un'alterazione dell'attività dell'AChE potrebbe essere correlata a disturbi neuronali quali alterazione della memoria o della capacità di attenzione, spesso suggeriti come possibili conseguenze dell'esposizione a campi.

Le cellule sono state esposte a campi elettromagnetici con frequenza pari a 1.8 GHz mediante il sistema espositivo realizzato dalla IT'IS Foundation di Zurigo, nelle tre modalità di irraggiamento previste CW, GSM 217 Hz, GSM Talk, con segnale intermittente 5 min ON/10 min OFF per 4, 16 e 24 ore. L'analisi dell'attività enzimatica dell'AChE è stata eseguita per determinare eventuali variazioni nella velocità di reazione dell'enzima con il suo substrato, generate dall'esposizione ai campi elettromagnetici. I trattamenti sono stati confrontati con campioni di controllo posti nelle stesse condizioni dei campioni esposti, ma in assenza di campi elettromagnetici. In tutte e tre le modalità di irraggiamento l'attività enzimatica dell'AChE è aumentata significativamente solo per il periodo espositivo di 24 ore, rimanendo inalterata rispetto ai controlli per i periodi espositivi di 4 e 16 ore. Per questo motivo in seguito è stata valutata la cinetica di reazione dell'AChE esclusivamente per un'esposizione di 24 ore, in maniera tale da determinare l'attività dell'enzima in presenza di concentrazioni crescenti di substrato valutando i parametri V_{max} e K_m che rappresentano le grandezze caratterizzanti una cinetica enzimatica. In particolare, la V_{max} corrisponde alla velocità di reazione massima ottenibile quando tutto l'enzima viene utilizzato nella reazione e la K_m esprime l'affinità dell'enzima per il substrato. L'analisi della cinetica enzimatica in seguito ad esposizione per 24 ore ai campi elettromagnetici ha evidenziato un aumento significativo rispetto ai campioni di controllo della V_{max} mentre i valori di K_m rimanevano costanti in tutte e tre le modalità di irraggiamento. Dato che per definizione la V_{max} è indicatrice della quantità di molecole di enzima che hanno reagito con il substrato, si è ipotizzato che l'esposizione per 24 ore ai campi elettromagnetici potesse causare un aumento della quantità di enzima.

Allo scopo di verificare questa ipotesi è stata analizzata sia l'espressione proteica dell'AChE mediante Western Blotting, che l'espressione genica mediante PCR. E' stato

svolto un esperimento preliminare per determinare gli effetti sull'attività e l'espressione dell'AChE da parte di un attivatore del segnale AMP-ciclico dipendente, noto per indurre l'attività e l'espressione dell'enzima. Questa fase aveva lo scopo di valutare la capacità dell'AChE delle cellule PC12 di rispondere ad uno stimolo noto e verificare che i metodi di analisi utilizzati fossero in grado di rilevare eventuali variazioni nell'attività e nell'espressione dell'AChE. A questo scopo le cellule PC12 sono state trattate per 48 h con una soluzione di forskolin 10 μ M (Choi et al 2008) ed in seguito sono state effettuate le analisi per valutare l'attività enzimatica, l'espressione proteica e l'espressione genica dell'AChE. I risultati ottenuti hanno evidenziato un aumento significativo dell'attività e dell'espressione dell'AChE rispetto ai campioni di controllo di circa 4 volte. Questo risultato ha mostrato la capacità dell'AChE delle cellule PC12 di rispondere ad uno stimolo che attiva il segnale AMP-ciclico dipendente e la possibilità di poterlo rilevare con i metodi di indagine messi a punto in questo lavoro di Tesi e per questo è stato considerato un controllo positivo.

In seguito, sulle cellule PC12 sono stati condotti gli esperimenti di esposizione ai campi elettromagnetici ad alta frequenza e sono state svolte le analisi al fine di rilevare eventuali variazioni dell'espressione dell'AChE.

Le cellule sono state esposte anche in questo caso a campi elettromagnetici nelle tre modalità di irraggiamento (CW, 217 Hz amplitude modulation, Talk) con segnale intermittente 5 min ON/10 min OFF per 4, 16 e 24 ore, ad un valore medio di SAR pari a 2W/Kg. In seguito sono stati utilizzati anticorpi specifici per la rivelazione della proteina AChE mediante Western Blotting. Questa fase ha consentito di valutare se l'esposizione ai campi elettromagnetici avesse aumentato la quantità di proteina nei campioni irraggiati, delineando così un aumento dell'attività enzimatica dovuta ad un aumento del numero di molecole di enzima. I risultati però non hanno mostrato alcun aumento o riduzione significativa dell'espressione proteica dell'AChE rispetto ai campioni di controllo, in alcuna delle modalità di irraggiamento testate e per nessun tempo di esposizione.

E' stata poi valutata l'espressione genica dell'AChE utilizzando primers specifici designati al riconoscimento di un frammento di 452 pb del prodotto genico AChE. Anche in questo caso le cellule sono state esposte ad irraggiamento nelle tre modalità descritte in precedenza per 4, 16 e 24 ore. In seguito è stato estratto l'mRNA, retroscritto e amplificato mediante PCR multiplex semiquantitativa. Le analisi eseguite sui trascritti di mRNA non hanno evidenziato alcun aumento o riduzione significativa dei livelli genici dell'AChE in nessuna modalità espositiva e per nessuno dei periodi espositivi testati.

In letteratura sono presenti diversi studi che hanno verificato un effetto sull'attività dell'AChE in seguito ad esposizioni a campi elettromagnetici e come è stato già descritto nel capitolo 4 di questa tesi (tabella 10) gli effetti variano al variare del modello studiato e della natura dei campi incidenti. Tuttavia è ormai chiaro che l'AChE è da considerarsi un bersaglio dei campi elettromagnetici, anche se vi sono ancora dubbi su quali siano le interazioni a livello molecolare che generano l'alterazione della sua attività.

Alcuni studi hanno evidenziato che in seguito ad irraggiamento da campi elettromagnetici a frequenza di 50 Hz su eritrociti e sinaptosomi veniva variata l'attività dell'AChE. In particolare, questi studi mostravano come negli esperimenti svolti variasse la V_{max} dell'enzima nei campioni irraggiati rispetto a quelli non irraggiati, e al contrario la K_m rimaneva costante. Questo può significare in prima battuta che i campi elettromagnetici non influenzavano l'affinità dell'enzima per il substrato al livello del suo sito attivo (K_m costante), ma probabilmente interagivano con altri domini della proteina diversi dal sito di interazione con il substrato, o modificando alcune caratteristiche del microambiente di membrana. A questo proposito in esperimenti sull'enzima solubilizzato mediante Triton 0.1% si notava che l'attività dell'enzima esposto a campi elettromagnetici rimaneva invariata. Questo risultato suggeriva che l'azione dei campi elettromagnetici venisse mediata dall'organizzazione e dalle strutture di membrana che influenzano profondamente il funzionamento dell'AChE. Infatti, la frazione lipidica legata all'enzima si inserisce nel doppio strato fosfolipidico e permette alla proteina di muoversi lungo la superficie di membrana per "cercare" le molecole di substrato. Il cambiamento delle condizioni all'interno della matrice lipidica, dove l'enzima è inserito attraverso i siti di ancoraggio, potrebbe avere profonda influenza sulla flessibilità della proteina, un requisito fondamentale per la sua attività funzionale (Morelli et al 2005, Calzia et al 2010). È stato infatti già riportato che campi pulsati con frequenza di 50 Hz possano indurre variazioni nelle dinamiche molecolari dei lipidi presenti nelle membrane cellulari (Volpe et al 1998).

Nella nostra ricerca è stato studiato l'effetto dei campi elettromagnetici ad alta frequenza, quindi segnali diversi da quelli appena descritti. Tuttavia, dai risultati di questa Tesi si evidenzia un aumento dell'attività enzimatica dell'AChE per un'esposizione di 24 h a campi ad alta frequenza, valutato come aumento di V_{max} ; abbiamo quindi ipotizzato che l'effetto non fosse sul sito attivo dell'enzima, che si sarebbe esplicato in una variazione dell'affinità per il substrato (la K_m infatti rimaneva costante). L'effetto poteva essere invece ben giustificato da un aumento dell'espressione genica e proteica. Tuttavia, questo non è stato osservato. Pertanto potremmo ipotizzare, come in altri studi (Morelli et al. 2005), che

i campi incidenti abbiano modificato l'attività dell'enzima agendo sul microambiente di membrana, modificando quindi componenti come la matrice lipidica o la flessibilità dell'enzima che ne influenzano l'attività ma non hanno un effetto diretto sulla sua molecola. Questo suggerirebbe che l'aumento dell'attività enzimatica sia dovuto non ad un aumento della concentrazione di enzima (come detto in precedenza non riscontrato nell'espressione proteica e nell'espressione genica), bensì ad una variazione del *numero di turnover* dell'AChE ossia un'augmentata capacità dell'enzima di idrolizzare il substrato. Oltre che influenzandone il microambiente di membrana, questo effetto potrebbe essere anche dovuto ad una interazione campi elettromagnetici – proteina, con modificazioni esterne al sito attivo. Queste ipotesi necessitano di studi approfonditi per una possibile verifica.

L'effetto osservato sull'aumento dell'attività enzimatica era significativo dopo 24 ore di irraggiamento, ma alle 24 ore l'espressione genica non appariva modificata. Si potrebbe obiettare che il picco massimo di espressione genica possa verificarsi prima delle 24 ore di esposizione. Tuttavia possiamo escludere questa ipotesi, visto che l'espressione genica dell'AChE è stata valutata anche per tempi di esposizione più brevi come 4 e 16 ore senza osservare variazioni.

Un'altra possibilità che abbiamo tenuto considerazione per spiegare che l'aumento di V_{max} non corrisponda ad un aumento di espressione è che, essendo l'AChE presente in due isoforme, l'attività rifletta quella di entrambe ma l'espressione proteica e genica siano riferite ad una soltanto, che eventualmente non viene alterata dai campi. Dalla letteratura si evince che il 98% dell'AChE nelle cellule dei vertebrati (ad eccezione dei globuli rossi) sia di tipo T e solo il 2% di tipo R. In ogni caso l'anticorpo usato per la valutazione della espressione proteica e i primer utilizzati nella valutazione della espressione genica sono stati generati per riconoscere sequenze comuni alle due isoforme, quindi con i nostri metodi la possibilità di analizzare diverse isoforme nei diversi approcci non sussiste.

Occorre dire che nonostante la valutazione dell'espressione genica sia avvenuta mediante PCR multiplex semiquantitativa, che già di per sé è una tecnica molto precisa, nel caso di effetti piccoli come quelli dovuti ai campi elettromagnetici, potrebbe essere funzionale l'analisi mediante *PCR real time*, la metodica più sensibile in questo ambito di ricerca, che permette di valutare in tempo reale il numero di molecole di trascritto. L'utilizzo di questa metodica è già oggetto di interesse presso il Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale, al fine di approfondire questi risultati in ricerche future.

8. CONCLUSIONI

Dai numerosi studi riguardanti i possibili effetti biologici dei campi elettromagnetici emergono dati spesso contraddittori e poco confrontabili l'uno con l'altro perché condotti in condizioni sperimentali differenti. Inoltre, soprattutto per quanto riguarda le alte frequenze, molti risultati sperimentali sono stati criticati per il dubbio rigore sperimentale concernente in particolare la dosimetria e l'analisi dei dati. Il nostro studio si è avvalso di uno strumento che simula i segnali GSM emessi dai telefoni cellulari, costruito e validato dall'IT'IS di Zurigo, che ci assiste nel decrittare i file di dati concernenti il controllo delle funzioni dello strumento prodotti ad ogni esperimento. Stabilita questa condizione imprescindibile in studi di questo tipo, i risultati della ricerca hanno indicato che l'esposizione di cellule PC12 a campi elettromagnetici ad alta frequenza per 24 ore (1.8 GHz; SAR medio 2W/Kg; 5min on/10 min off) causa un aumento della velocità massima di reazione dell'enzima AChE. Questo dato è in accordo con vari altri studi che hanno riportato un aumento o una diminuzione dell'attività dell'AChE in diversi tipi di cellule esposte a campi elettromagnetici a bassa o alta frequenza, indicando l'enzima come un bersaglio di questi segnali. Diversamente da quanto atteso, l'aumento dell'attività enzimatica non è stato accompagnato da un aumento dell'espressione genica o proteica dell'AChE. A nostra conoscenza questo lavoro è il primo in cui l'attività e l'espressione genica e proteica dell'enzima AChE sono analizzate contemporaneamente nelle stesse cellule dopo esposizione a campi elettromagnetici, pertanto le nostre osservazioni non sono al momento paragonabili con altre ottenute in altri laboratori. Il fatto che l'attività dell'enzima non aumenti né per un aumentato numero di molecole né per un'aumentata affinità dell'enzima per il substrato, suggeriscono indirettamente che i campi elettromagnetici modifichino l'attività dell'AChE agendo sul microambiente di membrana che circonda l'enzima. Altri effetti dei campi elettromagnetici ottenuti su cellule nervose, come ad esempio l'apertura di canali ionici, sono stati correlati a modificazioni a carico degli elementi polari della membrana plasmatica. Pertanto, questi risultati indicano che l'attività dell'AChE è modificata dall'esposizione prolungata a campi elettromagnetici a frequenza 1.8 GHz probabilmente a causa della interazione dei campi con il microambiente di membrana che circonda l'enzima. I nostri esperimenti non forniscono tuttavia informazioni circa il significato di questi effetti ai fini della salute, destinando ad ulteriori studi la risposta a questo importante quesito.

BIBLIOGRAFIA

- Adair, E.R.; Adams, B.W. Microwaves modify thermoregulatory behavior in squirrel monkey. *Bioelectromagnetics*; 1:1-20; 1980.
- Atanasova E, Chiappa S, Wieben E, Brimijoin S. Novel messenger RNA and alternative promoter for murine acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 21078-21084.
- Barron C.I.; Baraff A.A.; Medical consideration to exposure of microwaves (radar) *J. Am. Med. Assoc.* 168: 1194 -1199; 1958
- Beall, C.; Delzell, E.; Cole, P.; Brill, I. Brain tumors among electronics industry workers. *Epidemiology*; 7:125–130; 1996.
- Bon S, Coussen F, Maoussulié J. Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The poliprolin attachment domain of the collagen tail. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3016-3021.
- Brusick D, Albertini R, McRee D, Peterson D, Williams G, Hanawalt P (1998): Genotoxicity of Radiofrequency Radiation. *Environ. Mol. Mut.* 32: 1-16.
- Bursztajn S., Schneider L. W., Jong Y.-J. And Berman, S.T. (1991). Calcium and ionophore A23187 stimulates deposition of extracellular matrix and acetylcholinesterase release in myotubes. *Cell Tiss. Res.* 265, 95-103.
- Byus, C.V.; Pieper, S.E.; Adey, W.R. The effects of low-energy 60 Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis*; 8:1385–1389; 1987.
- Byus, C.V.; Kartun, K.; Pieper, S.; Adey, W.R. Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res.*; 48:4222–4226; 1988.
- Calzia D, Ravera S, Bianco B, Cugnoli C, Pandolfi I, Morelli A, Pepe I.M. Effects of ELF magnetic field on acetylcholinesterase activity in synaptosomal membranes. *Atti del Congresso “Attività di ricerca del centro interuniversitario ICEmB a vent’anni dalla sua costituzione”* Genova, 25-26 Febbraio 2010
- Choi Roy CY, Mok Mokka KW, Cheung Anna WH, Siow L. Nina. Regulation of PriMA-linked G₄ AChE by cAMP-dependent signalling pathway in cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 76-78.
- Chubb I. W., and Smith A.D. (1975). Release of Acetylcholinesterase into the perfusate from the ox adrenal gland. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 191, 263-269.

- Clearly SF, Du Z, Kao G, Lu LM, Mc Crady C. Effects of isothermal radiofrequency radiation on cytotoxic T lymphocytes. *FASEB Journal*, 10, 913-919, 1996.
- Cotgreave IA. Biological stress responses to radio frequency electromagnetic radiation: are mobile phones really so (heat) shocking? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 435 (2005) 227–240
- Cridland, N.A. Electromagnetic fields and cancer: a review of relevant cellular studies. Chilton, UK; National Radiological Protection Board; Report NRPB-R256; 1993.
- Czerska EM, Elson EC, Devis CO, Swicord ML, Czernski P. Effects of continuous and pulsed 2450 MHz radiation exposure on spontaneous transformation of human lymphocytes in vitro. *Bioelectromagnetics*, 13, 247-259, 1992.
- D'Ambrosi N, Murra B, Vacca F, Volontè C, 2004. Pathways of survival induced by NGF and extracellular ATP after growth factor deprivation. *Prog. Brain Res.* 149: 93-100.
- D'Andrea, J.A.; DeWitt, J.R.; Gandhi, O.P.; Stensaas, S.; Lords, J.L.; Neilson, H.C. Behavioral and physiological effects of chronic 2450-MHz microwave irradiation of the rat at 0.5 mW/cm². *Bioelectromagnetics*; 7:45-56; 1986.
- De Lorge, J.O.; Ezell, C.S. Observing responses of rats exposed to 1.28- and 5.62-GHz microwaves. *Bioelectromagnetics*; 1:183-198; 1980.
- Deutesch VR, Pick M, Perry C, Grisaru D, Hemo Y, Golan-Hadari D, Grant A, Eldor A, Soreq H: the stress associated acetylcholinesterase variant AchE-R is expressed in human CD34(+) hematopoietic progenitors and its C-terminal peptide ARP promotes their proliferation. *Exp Hematol* 2002, 30: 1153-1161.
- Dolk, H.; Shaddick, H.; Walls, P.; Grundy, C.; Thakrar, B.; Kleinschmidt, I.; Elliot, P. Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain, Part I. Sutton Coldfield Transmitter. *Am. J. Epidemiol.*; 145:1–9; 1997a.
- Dolk, H.; Elliot, P.; Shaddick, G.; Walls, P.; Thakrar, B. Cancer incidence near radio and television transmitters in Great Britain, Part II. All high-power transmitters. *Am. J. Epidemiol.*; 145:10–17; 1997b.
- Dutta SK, Subramoniam A, Ghosh B, Parshad R (1984): Microwave Radiation-Induced Calcium Ion Efflux from Human Neuroblastoma Cells in Culture. *Bioelectromagnetics* 5: 71-78.
- Ellman GL, Courtney KD and Featherstone RM (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7:88-95.

- Feng G, Krejci E, Molgo J, Cunningham J.M, Massoulié J, Sanes J.R. Genetic analysis of collagen Q: roles in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase assembly and in synaptic structure and function, *J. Cell Biol.* 144 (1999) 1349–1360.
- 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.
- Goodman, R.; Bassett, C.A.; Henderson, A.S. Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription. *Science*; 220:1283–1285; 1983.
- Goodman, R.; Henderson, A.S. Exposure of salivary gland cells to low-frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.*; 85:3928–3232; 1988.
- Goodman, R.; Henderson, A.S. Transcription and translation in cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.*; 25:335–355; 1991.
- Greene LA and Tischler AS. PC12 pheocromocytoma cultures in neurobiological research. *Advances in cellular neurobiology*, volume 3 1976.
- Greene, J.J.; Skowronski, W.J.; Mullins, J.M.; Nardone, R.M. Delineation of electric and magnetic field effects of extremely low frequency electromagnetic radiation on transcription. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 174:742–749; 1991.
- Grayson, J.K. Radiation exposure, socioeconomic status, and brain tumor risk in the US Air Force: a nested case-control study. *Am. J. Epidemiol.*; 143:480–486; 1996
- Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L. et al.: Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active site gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9031-9035, 1993.
- Hocking, B.; Gordon, I.R.; Grain, M.L.; Hatfield, G.E. Cancer incidence and mortality and proximity to TV towers. *Med. J. Australia*; 165:601–605; 1996.
- Inestrosa N. C, Reiness C. G, Reichardt L. F, and Hall Z. W. (1981). Cellular localization of the molecular forms of acetylcholinesterase in rat pheocromocytoma PC12 cells treated with nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1, 1260-1267.
- Inestrosa MC, Alvarez A, Perez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid. beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996, 16:881-891.

- Juutilainen J, de Seze R (1998): Biological effects of amplitudemodulated radiofrequency radiation. *Scand. J. Work Environment & Health* 24 (4): 245-254.
- Kerbacher JJ, Meltz ML, Erwin DN. Influence of radiofrequency radiation on chromosome aberrations in CHO cells and its interaction with DNAdamaging agents. *Radiat Res* 1990;123(3):311-9
- Krejci E., Coussen F., Duval N., Chatel J.M., 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.* 10 (1991) 1285–1293.
- Krejci E., Thomine S., Boschetti N., Legay C., Sketelj J., Massoulié J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 22840–22847.
- Lacy-Hulbert, A.; Wilkins, R.C.; Hesketh, T.R.; Metcalfe, J.C. No effect of 60 Hz electromagnetic fields on MYC or beta-actin expression in human leukemic cells. *Rad Res.*; 144:9–17; 1995.
- Lai, H.; Singh, N.P. Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int. J. Radiation Biol.*; 69:513–521; 1996.
- Layer PG, Weikert T, Alber R: Cholinesterases regulate neurite growth of chick nerve cells in vitro by means of non-enzymatic mechanism. *Cell Tissue Res* 1993, 273: 219-226.
- Li Y, Camp S, Rachinsky T L, Getmaan D, Taylor P. Gene structure of mammalian acetylcholinesterase. Alternative exons dictate tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23083-23090.
- Li Y, Camp S, Taylor P. Tissue-specific expression and alternative mRNA processing of the mammalian acetylcholinesterase gene. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 5790-5797.
- Li-ji Zhu, Scott W. Altmann. mRNA and 18S-RNA coapplication–reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Analytical Biochemistry* 345 (2005) 102–109.
- Liburdy, R.P. Biological interactions of cellular systems with time-varying magnetic fields. *Ann. NY Acad. Sci.*; 649:74–95; 1992.
- Lillienfeld, A.M.; Tonascia, J.; Tonascia, S.; Libauer, C.A.; Cauthen, G.M. Foreign service health status study — evaluation of health status of foreign service and other

- employees from selected eastern European posts. Final report. Washington, DC, Department of State; Contract No. 6025-619073, NTIS PB-288163; 1978.
- Litovitz, T.A.; Krause, D.; Mullins, J.M. Effect of coherence time of the applied magnetic field on ornithine decarboxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 178(3):862–865; 1991.
- Litovitz, T.A.; Krause, D.; Penafiel, M.; Elson, E.C.; Mullins, J.M. The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity. *Bioelectromagnetics*; 14:395–403; 1993.
- Maes A, Verschaeve L, Arroyo A, De Wagter C, Vercruyssen L. In vitro cytogenetic effects of 2450 MHz waves on human peripheral blood lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 1993;14(6):495-501
- Massoulié 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.
- Massoulé J, Perrier N, Nouredine H, Liang D, Bon S. Hold and new questions about cholinesterases. *Chemico-Biological interactions* 175 (2008) 30-44.
- McCann, J.; Dietrich, F.; Rafferty, C.; Martin, A. A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutation Res.*; 297:61–95; 1993.
- McLean, J.; Stuchly, M.A.; Mitchel, R.E.; Wilkinson, D.; Yang, H.; Goddard, M.; Lecuyer, D.W.; Schunk, M.; Callary, E.; Morrison, D. Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60-Hz magnetic field: II. Tumor development and immune response. *Bioelectromagnetics*; 12:273–287; 1991.
- Melega WP and Howard BD. Choline and Acetylcholinesterase metabolism in pC12 secretory cells. *Biochemistry* 1981, 20, 4477-4483.
- Meyer R, Hambach U, Achenbach F, Linz K (1998): The Influence of Amplitude Modulated Radiofrequency Fields on the Calcium current into Human Neuroblastoma Cells. 20th An. Bioelectromagnetics Meeting, St. Petersburg, Russia, p.55.
- Michaelson, SM. Biological effects on health hazards of RF and MW energy: Fundamentals and overall phenomenology. In: Grandolfo M; Michaelson SM; Rindi A, eds. *Biological effects and dosimetry of nonionizing radiation*. New York, Plenum Press; 337-357; 1983.

- Morelli A, Ravera S, Panfoli I, Pepe I.M. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on membrane-associated enzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 441(2005) 191-198
- Murphy, J.C.; Kaden, D.A.; Warren, J.; Sivak, A. Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology. *Mutation Res.*; 296:221–240; 1993.
- National Radiological Protection Board. Electromagnetic fields and the risk of cancer. Report of an Advisory Group on Non-ionising Radiation. Chilton, UK, National Radiological Protection Board; NRPB Documents 3(1); 1992.
- Patočka J, Cabal J, Kuča K, Jun D. Oxime Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorous esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *J. Appl. Biomed.* 3: 91-99, 2005
- Perrier A.L., Massoulie J., Krejci E. PRiMA, the membrane anchor of acetylcholinesterase in brain, *Neuron* 33 (2002) 275–285.
- Perrier N.A, Kh´erif S, Perrier A.L, Krejci E, Dumas S, Mallet J, Massoulie J. Expression of PRiMA, the membrane anchor of acetylcholinesterase, in the mouse brain, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 1837–1847.
- Perrier N, Salani M, Falasca C, Bon S, Augusti-Tocco G, Massoulié J. 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.
- Perry RH, Blessed G, Perry EK, Tomlinson BE (1980). Histochemical observations on cholinesterase activities in the brains of elderly normale and demented (Alzheimer-type) patients. *Age Aging* 9: 9-16.
- Phillips, J.L.; Haggren, W.; Thomas, W.J.; Ishida-Jones, T.; Adey, W.R. Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochim. Biophys. Acta*; 1132:140–144; 1992.
- Rannug, A.; Ekström, T.; Mild, K.H.; Holmberg, B.; Gimenez-Conti, I.; Slaga, T.J. A study on skin tumour formation in mice with 50 Hz magnetic field exposure. *Carcinogenesis*; 14:573–578; 1993a.
- Rannug, A.; Holmberg, B.; Ekström, T.; Mild, K.H.; Gimenez-Conti, I.; Slaga, T.J. Intermittent 50 Hz magnetic field and skin tumour promotion in Sencar mice. *Carcinogenesis*; 15:153–157; 1994.
- Robinette, C.D.; Silverman, C.; Jablon, S. Effects upon health of occupational exposure to microwave radiation (radar). *Am. J. Epidemiol.*; 112:39–53; 1980.

- Rossi SG and Rotundo RL. Cell surface acetylcholinesterase molecules on multinucleated myotubes are clustered over the nucleus of origin. *J Cell Biology* 1992 Dec; 119(6): 1657-1667.
- Rothman, K.J.; Chou, C.K.; Morgan, R.; Balzano, Q.; Guy, A.W.; Funch, D.P.; Preston-Martin, S.; Mandel, J.; Steffens, R.; Carlo, G. Assessment of cellular telephone and other radio frequency exposure for epidemiologic research. *Epidemiology*; 7:291–298; 1996a.
- Rothman, K.J.; Loughlin, J.E.; Funch, D.P.; Dreyer, N.A. Overall mortality of cellular telephone customers. *Epidemiology*; 7:303–305; 1996b.
- Saffer, J.D.; Thurston, S.J. Cancer risk and electromagnetic fields. *Nature*; 375:22–23; 1995.
- Santos S, Vala I, Miguel C, Barata JT, Garção P, Agostinho P, Mendes M, Coelho A, Calado A, Oliveira C, Martins J, Silva J and Saldanha C. Expression and Subcellular localization of a novel nuclear acetylcholinesterase protein. *J Biol. Chemistry* vol. 282: 25597- 25603 (2007).
- Sarkar, S.; Ali, S.; Behari, J. Effect of low power microwave on the mouse genome: a direct DNA analysis. *Mutation Res.*; 320:141–147; 1994.
- Scholl FG, Scheiffele P. Making connections: cholinesterase domain proteins in the CNS. *Trends Neurosci.* 2003, 26: 618-624. Reviews the current status of our knowledge concerning the biological role of CLAMs.
- Schweitzer Erik S. Regulated and constitutive secretion of distinct molecular forms of acetylcholinesterase from PC12 cells. *Journal of Cell Science* 106, 731-740 (1993).
- Selvin, S.; Schulman, J.; Merrill, D.W. Distance and risk measures for the analysis of spatial data: a study of childhood cancers. *Soc. Sci. Med.* 34:769–777; 1992.
- Sienkiewicz, Z.J.; Cridland, N.A.; Kowalczyk, C.I.; Saunders, R.D. Biological effects of electromagnetic fields and radiations. In: Stone, W.R.; Hyde, G., eds. *The review of radio science: 1990-1992*; Oxford, Oxford University Press; 737–770; 1993.
- 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.* 13 (15) 3448-3455, 1994.
- Silman I and Sussman J.L. Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Current opinion in Pharmacology* 2005, 5: 293-302.
- Silman I and Sussman J.L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions* 175 (2008) 3-10.

- Silver A. The Biology of Holinesterases, North-Holland Research monographs, Amsterdam, 1974.
- Spratt KK. Transfection of PC12 cells: a model system for primary neuronal cells. *Quiagen News* 1998 Issue 4.
- Sternfeld M, Ming G, Gong H, Sela K, Timberg R, Poo M, Soreq H: Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C-termini.
- Sussman J.L., Harel M., Frolow F. et al.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253:872-879, 1991.
- Stern, S.; Margolin, L.; Weiss, B.; Lu, S.T.; Michaelson, S.M. Microwaves: effects on thermoregulatory behavior in rats. *Science*; 206: 1198-1201; 1979.
- Szmigielski, S.; Szudinski, A.; Pietraszek, A.; Bielec, M.; Wrembel, J.K. Accelerated development of spontaneous and benzopyrene-induced skin cancer in mice exposed to 2450-MHz microwave radiation. *Bioelectromagnetics*; 3:179–191; 1982.
- Szmigielski, S.; Bielec, M.; Lipski, S.; Sokolska, G. Immunologic and cancer-related aspects of exposure to low-level microwave and radiofrequency fields. In: Marino, A. A., ed. *Modern bioelectricity*. New York, Marcel Dekker; 861–925; 1988.
- Tenforde, T.S. Biological interactions of extremely-low-frequency electric and magnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenerg.*; 25:1–17; 1991.
- Tenforde, T.S. Biological interactions and potential health effects of extremely-low-frequency magnetic fields from power lines and other common sources. *Ann. Rev. Public Health*; 13:173–196; 1992.
- Tenforde, T.S. Cellular and molecular pathways of extremely-low-frequency electromagnetic field interactions with living systems. In: Blank, M., ed. *Electricity and magnetism in biology and medicine*. San Francisco, San Francisco Press; 1–8; 1993.
- Tenforde, T.S. Interaction of ELF magnetic fields with living systems. In: Polk, C.; Postow, E., eds. *Biological effects of electromagnetic fields*. Boca Raton, FL, CRC Press; 185–230; 1996.
- United Nations Environment Programme/World Health Organization/International Radiation Protection Association. *Electromagnetic fields (300 Hz to 300 GHz)*. Geneva, World Health Organization; Environmental Health Criteria 137; 1993.

- Verschaeve L, Maes AM (1998): Genetic, carcinogenetic and teratogenetic effects of radiofrequency field. *Mutation Res.* 410: 141- 165.
- Vijayalaxmi, Mohan N, Meltz ML, Wittler MA. Proliferation and cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to 2450 MHz radiofrequency radiation. *Int J Radiat Biol* 1997,72(6):751-7
- Volpe P, Parasassi T, Esposito C, Ravagnan G, Giusti A.M., Pasquarelli A, Eremenko T, “Cell Membrane lipid molecular dynamics in a solenoid vs. a magnetically shielded Room“, *Bioelectromagnetics*, vol.19, pp. 107-111. 1998
- Walleczek, J. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signalling. *The FASEB Journal*; 6:3177–3185; 1992.
- Walleczek, J.; Liburdy, R.P. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances Ca^{2+} uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. *FEBS Letters*; 271:157–160; 1990.
- Wertheimer, N.; Leeper, E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.*; 109:273–284;

Sitografia e altre fonti

1. www.arpav.it
2. www.elettra2000.it
3. www.iss.it/elet/
4. www.who.com
5. www.lexambiente.it
6. Guidelines for limiting exposure to time varying electric, magnetic and electromagnetic fields. *Health Physics* 74: 494-522 1998. (ICNIRP Review)
7. Promemoria n° 181, 182, 183, 193, 205, 263, 304 dell’*Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)*.
8. Effetti sanitari dei campi elettromagnetici a radiofrequenza: rapporto di un gruppo consultivo indipendente sulle radiazioni non ionizzanti. Documenti dell’NRPB: volume 14 n° 2.
9. Protezione dai campi elettromagnetici non ionizzanti (3^a edizione). Istituto di ricerca sulle onde elettromagnetiche “Nello Carrara” Firenze.
10. *Fisiologia Animale*. Hill R. - Wyse G. - Anderson M.
11. *Fisiologia degli animali*. A.Poli

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la Prof. Elena Fabbri perchè mi ha dato modo di lavorare a questa ricerca per la mia Tesi di Laurea, motivandomi e stimolandomi in ogni momento. Ho avuto la possibilità di far parte di un gruppo di ricerca, di applicare concretamente quello che ho studiato in tanti anni di corso e di sentirmi parte di qualcosa di importante. Inoltre la ringrazio per avermi supportato in tutto il periodo degli studi universitari, sin dai primi anni, e per avermi insegnato l'importanza e il valore della ricerca scientifica.

Ringrazio la Dott.ssa Paola Valbonesi perchè mi è stata vicino durante tutto il periodo di Tesi, aiutandomi in ogni fase della parte sperimentale e consentendomi assieme a lei di sviluppare giorno per giorno il lavoro in laboratorio. Insieme siamo riusciti a mettere a punto buona parte dei metodi utilizzati in questa Tesi e questo mi ha permesso di capire e sviluppare in modo critico l'importanza che sta dietro al lavoro sperimentale. Inoltre la ringrazio per tutte le “*risate*” che hanno fatto da sfondo ad ogni singola giornata passata insieme a lavorare su questa ricerca.

Ringrazio il Prof. Giorgio Sartor per il rapporto amichevole che abbiamo avuto in ogni momento e per i consigli e gli aiuti che mi ha dato nella fase di preparazione dell'elaborato finale.

Naturalmente un ringraziamento importante va a tutto lo staff del Laboratorio di Fisiologia e Biochimica Ambientale: la Dott.ssa Silvia Franzellitti, la Dott.ssa Sara Buratti, il Dott. Federico Brunelli e i miei “*colleghi di banco*” il Dott. Tullio Rossi e il Dott. Enrico Biolchini per avermi supportato e consigliato durante il periodo passato con loro, per l'amicizia e per aver creato assieme un clima che ci ha permesso di lavorare bene e con serenità all'interno del laboratorio.

Inoltre ringrazio tutti i Professori del corso di laurea in Scienze Ambientali perchè ognuno di loro ha contribuito alla mia formazione, insegnandomi il rigore e la bellezza delle discipline scientifiche e la possibilità di applicarle alle tematiche riguardanti l'interazione tra l'Uomo e l'Ambiente.

Un ringraziamento particolare va a tutti coloro che sono stati parte integrante dei miei anni universitari:

Ringrazio Gio, semplicemente per tutto, per ogni momento condiviso, per l'amicizia, per il supporto e per l'intensità con cui abbiamo vissuto assieme questi anni così importanti per la mia vita.

Ringrazio Beppe e Monica per l'amicizia che abbiamo condiviso dal primo anno di corso, per le ansie e i problemi legati spesso agli esami e per il forte legame che sento di avere con loro.

Ringrazio Cristiano e Marco per essermi stati sempre vicino e per aver instaurato con me un'amicizia tanto unica quanto importante. Li ringrazio in particolar modo per tutte le sere e i pomeriggi passati assieme e per tutte le “*discussioni illuminanti*” che hanno fatto da sfondo a questi anni.

Ringrazio Emilio per tutte le risate e le serate passate assieme a fare i matti. Inoltre lo ringrazio per tutti i passaggi in macchina ottenuti su skype all'ultimo minuto per muoverci di sera e andare in un locale, piuttosto che al mare o a qualche concerto.

Ringrazio tutti i miei colleghi, i compagni di Università, e i miei coinquilini, nessuno escluso, perchè in questi anni abbiamo instaurato delle buone amicizie e abbiamo sempre fatto gruppo...”*noi siamo quelli che studiamo (o studiavano) a Ravenna*”.. l'ho sempre vista in questo modo...

Ringrazio tutti i miei amici di San Salvo, perchè ci conosciamo da una vita, e anche se negli ultimi sei anni non ci sono stato molto mi hanno sempre fatto sentire uno di loro. So che capiscono che aver vissuto intensamente qui a Ravenna la mia esperienza universitaria è stato di fondamentale importanza per quello che sono diventato.

Inoltre, ringrazio in particolar modo tutta la mia famiglia, tutti i miei zii, tutti i miei cugini e la mia nonna, perchè per ogni singola volta che mi hanno chiesto come proseguivano i miei studi, hanno contribuito a rendere importante tutto quello che facevo.

Infine ringrazio mia Madre, semplicemente per tutto, per il bene che mi vuole e per tutti i sacrifici che ha fatto per vedermi raggiungere questo traguardo. La ringrazio per tutte le volte che mi ha chiamato per chiedermi come stavo e sapere come era andata la giornata. E' importante avere qualcuno che lo fa.

E'anche grazie a lei se sono riuscito a raggiungere questa meta così importante.

Grazie a tutti.