



Unione Europea



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



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

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

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

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

Riassunto

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

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

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

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

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

Riassunto

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

It is noteworthy that, as a confirmation of the results reported in this research project, in the same period, RF-induced AR has been reported by other research

Abstract

groups, both *in vitro* on HL-60 cell cultures (Jin et al., 2012), and *in vivo* on mice and rats (Cao et al., 2010, 2011; Jiang et al., 2012; Mortazavi et al., 2011, 2012), by evaluating different biological targets.