

Esposizione a campi elettromagnetici a radiofrequenza:

approccio sperimentale &
effetti in vitro

Maria Rosaria Scarfì

CNR - IREA, Napoli

scarfi.mr@irea.cnr.it

Novara, 6 - 8 giugno 2012



Sommario

- ➔ Introduzione
- ➔ approccio sperimentale
- ➔ co-esposizioni
- ➔ RF e cancerogenesi
- ➔ endpoints biologici maggiormente studiati
- ➔ principali risultati
- ➔ open questions
- ➔ Attività presso l'IREA - CNR

Microonde

Rischio per operatori radar e delle
apparecchiature medicali o elettroniche

Comunicazioni Wireless

Rischio per gli utilizzatori e per le antenne
dislocate sul territorio (3 bilioni di telefonini)

Esposizioni combinate

Effetti cooperativi con agenti chimici e/o fisici

Effetti Termici

trasformazione di energia elettromagnetica in calore

- caratteristiche del materiale biologico
- frequenza e intensità del campo
- durata dell'esposizione
- contenuto in acqua dei tessuti irradiati

Organi bersaglio: poco irrorati; più superficiali (testicoli, occhi)

Effetti non Termici

alterazioni in assenza di incremento di temperatura

- interazioni con strutture molecolari
- meccanismi di azione non ancora ben conosciuti

Meccanismi

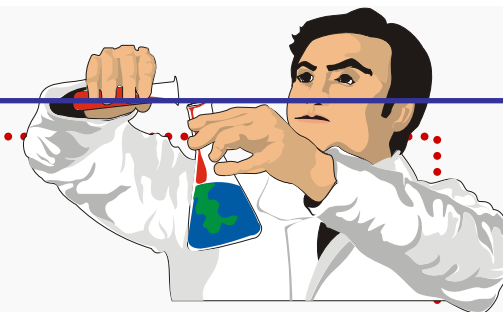


Effetti termici ben noti
Calore dovuto all'assorbimento di energia

Whole-body SAR > 4 W/kg
SAR locale > 100 W/kg

Altri meccanismi in corso di studio

ICNIRP recommendations for public
Whole-body SAR 0.08 W/kg (0.4 for workers)
Local SAR 2 W/kg (4 for workers)



Studi in vitro

Meno dispendiosi e più rapidi

Ampia base statistica

Poche limitazioni nelle condizioni di esposizione da
saggiare

Sperimentazioni “mirate”

Mancanza della complessità di sistemi e organi

Difficoltà nella selezione del modello biologico

Risultati non sempre semplici da interpretare, estrapolare e
confrontare

in vitro



in vivo



Epidemiologia

Standard di qualità per esposizioni *in vitro* (WHO)

✓ **Adottare condizioni di esposizione ben definite**

Distribuzione omogenea del CEM nel campione (dosimetria numerica e sperimentale)

Controllo delle possibili interferenze (compatibilità elettromagnetica)

Espositore di dimensioni idonee da essere ospitato in incubatori per colture cellulari

Controllo dei parametri ambientali (temperatura, umidità, CO₂)

✓ **Condurre esposizioni simultanee di più campioni**

Per consentire una appropriata analisi statistica dei risultati

✓ **Allestire campioni sham-esposti e controlli positivi**

Campioni ospitati in un secondo sistema di esposizione ma in assenza di campo per avere le stesse condizioni ambientali dei campioni esposti

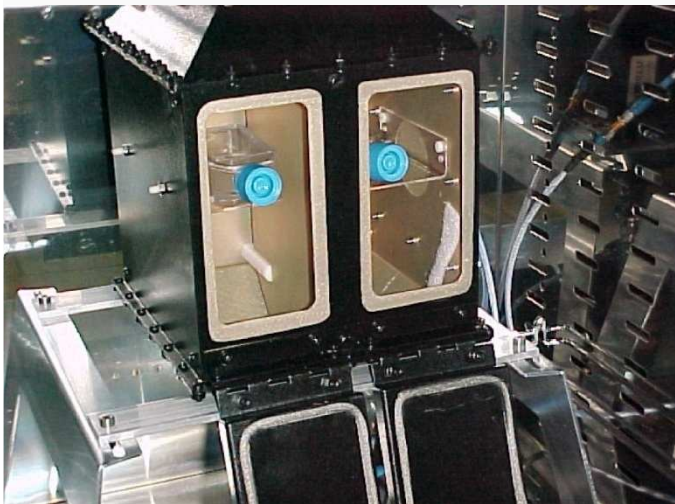
✓ **Condurre esposizioni in cieco**

✓ **Condurre studi di ripetizione in laboratori indipendenti**

Studi di ripetizione

- Confrontare **studi da differenti laboratori** è spesso difficile per la grande variabilità delle condizioni sperimentali adottate (tipi cellulari, segnale, condizioni di esposizione, durata dell'esposizione)
- Studi per confermare dati positivi spesso falliscono: importanza degli **studi di replicazione/conferma**
 - **Potenza statistica** generalmente bassa (nella maggior parte degli studi *in vitro* $n=3$)
 - **Analisi statistica** non sempre appropriata

Sistemi di esposizione



Cella TEM– campo EM non molto omogeneo; notevole numero di campioni

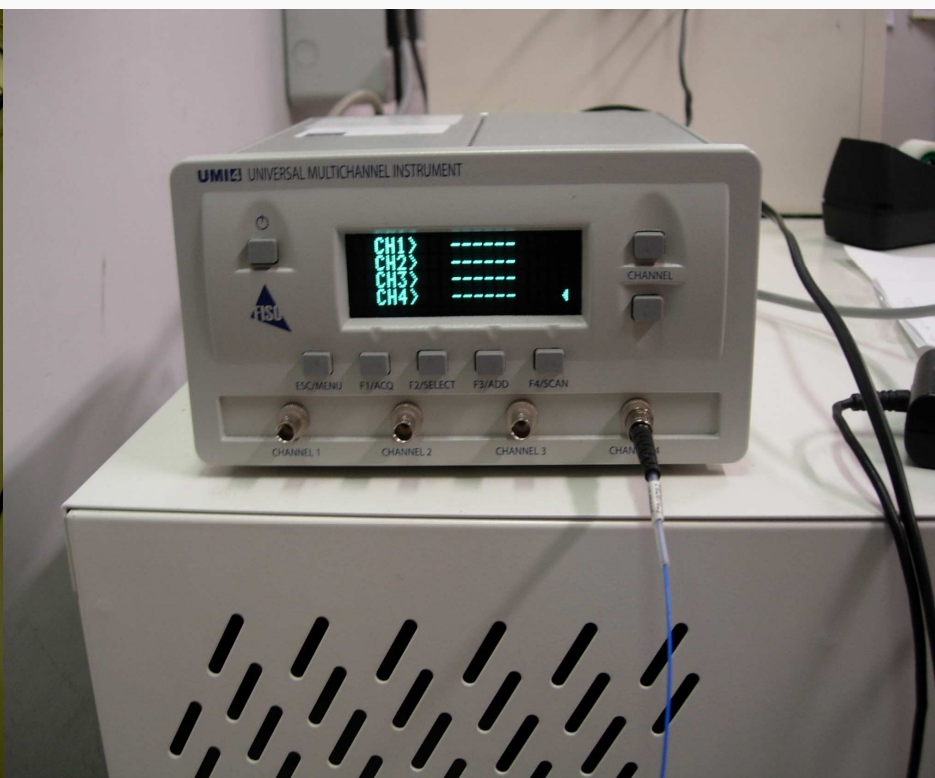
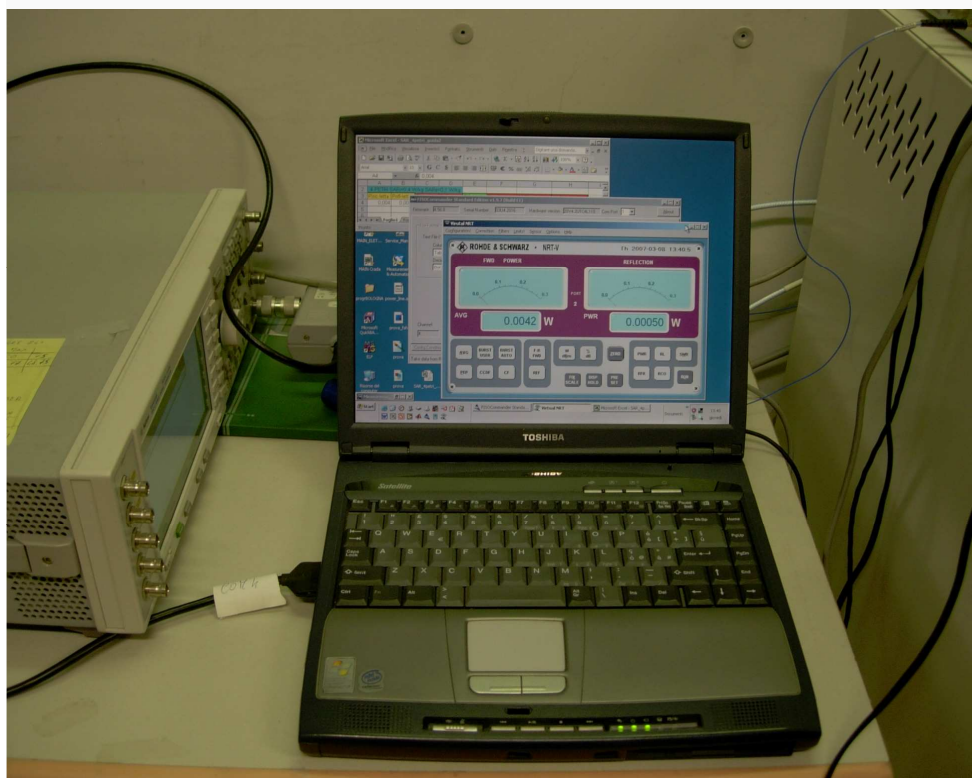


Guida d'onda – buona omogeneità di CEM ma in pochi campioni



WPC – campo EM omogeneo; caratterizzazione non completa

Sistemi di esposizione



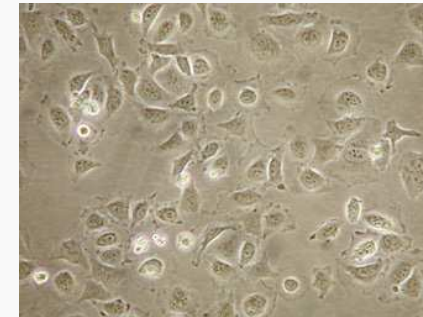
Costante controllo dei parametri dell'esposizione
e della temperatura nel campione

Novara, 6 - 8 giugno 2012

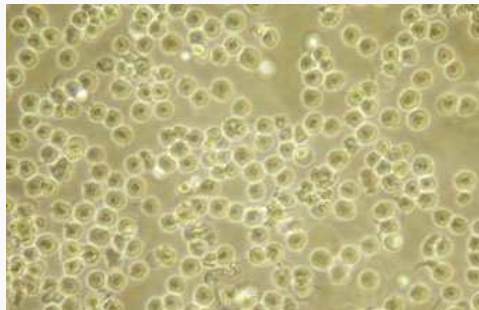
- Colture cellulari - sorgente di cellule dello stesso tipo



Colture primarie derivate direttamente dalla dissociazione di un tessuto. Hanno limitata capacità replicativa



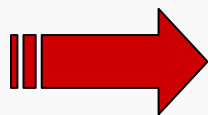
Cellule epiteliali



Cellule linfoblastoidi

Linee cellulari in grado di replicarsi indefinitamente in coltura, spesso usate come modelli sperimentali; derivano da colture primarie di tumori o da manipolazioni genetiche di colture non tumorali

da donatori sani



Rappresentative della
maggior parte della
popolazione

**da donatori affetti
da sindromi da
instabilità genetica**



Non rappresentative della
popolazione ma consentono
di identificare sottogruppi di
individui più sensibili e
massimizzare la probabilità di
individuare effetti



Sindrome di Bloom e Ataxia Telangectasia (instabilità cromosomica)



Anemia di Fanconi (stress ossidativo)

Co-esposizioni

RF + Agenti chimici o fisici a noto meccanismo di azione

valutare effetti cooperativi

massimizzare la probabilità di riscontrare effetti

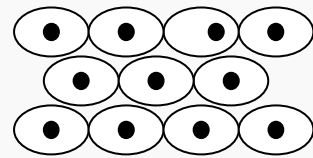
comprendere i meccanismi di azione

Svariati rotocolli di co-esposizione

(simultanea, precedente o successiva alla RF)

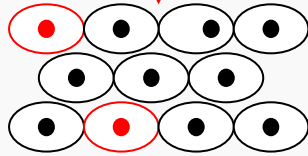
Novara, 6 - 8 giugno 2012

Cancerogenesi: un processo multi-fase



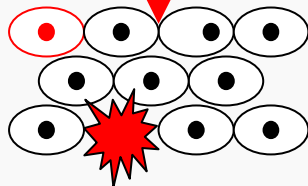
Cellule normali

Danno genotossico o di replicazione del DNA (**INIZIAZIONE**)



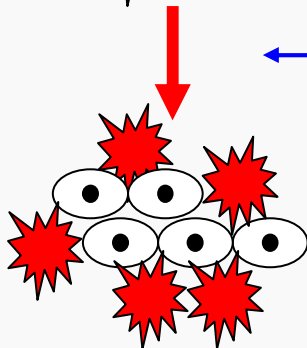
Conversione a cellule precancerose

Danno amplificato da un fattore non genotossico (**PROMOZIONE**)



Conversione a cellule cancerose

Tempo; fattori epigenetici (**PROGRESSIONE**)



Sviluppo del tumore

A livello cellulare

Omeostasi cellulare

**Proliferazione e
Vitalità cellulare**

Cancro

Apoptosi

Fenomeni altamente regolati
da pathways di segnale

A livello di meccanismi

genotossico mutagenotossico

Effetto diretto al DNA

Effetto indiretto

Danno DNA

Mutazioni,
delezioni,... in geni
coinvolti in

ODC, gap junctions,...
attivazione/repressione
di geni, proteine
coinvolti in

Stress ossidativo

Cancerogenesi

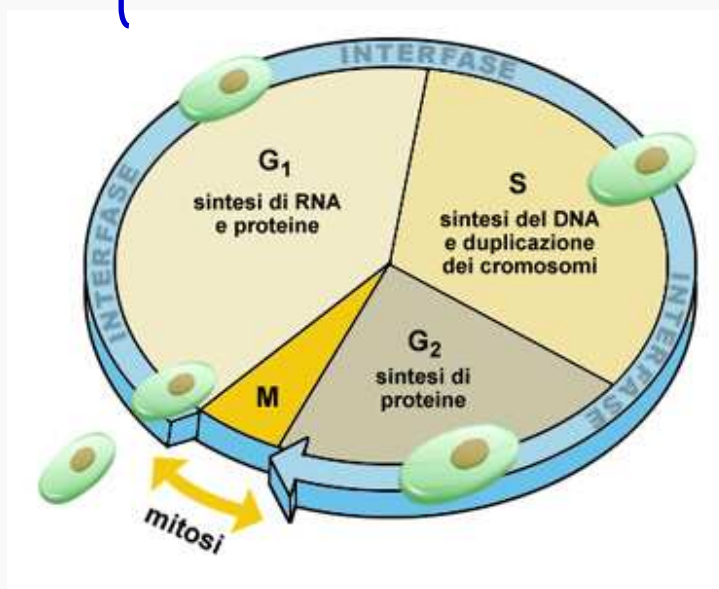
Vitalità e proliferazione cellulare

Vitalità

integrità della membrana
attività metabolica

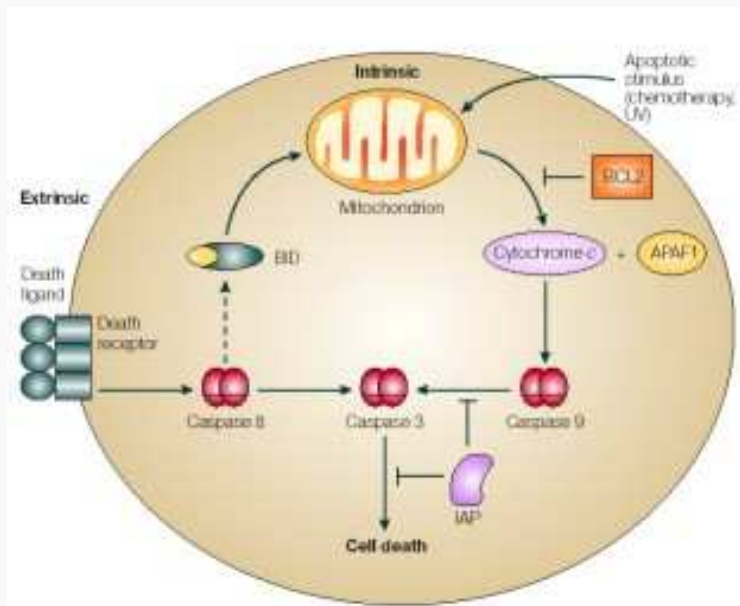
Proliferazione

cinetica del ciclo cellulare
ciclo cellulare



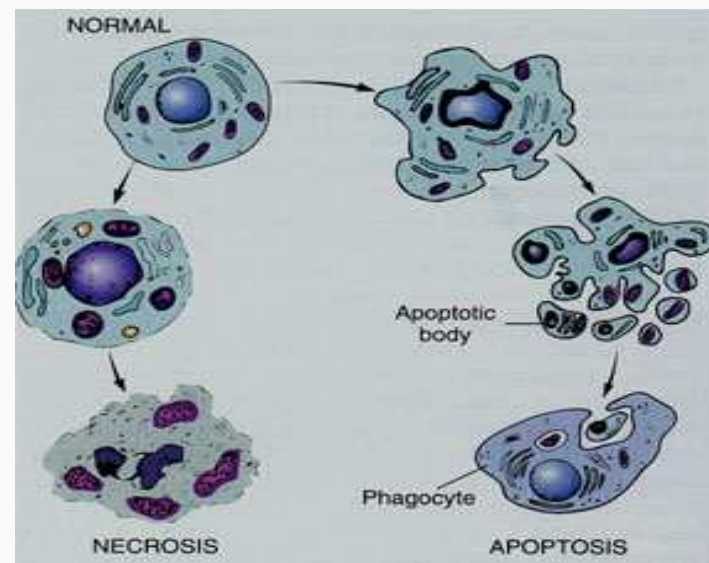
Novara, 6 - 8 giugno 2012

Alterazioni del processo apoptotico

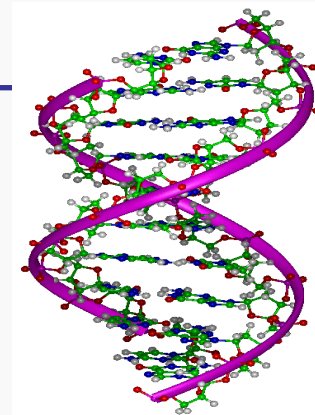


>apoptosi:disordini da perdita di cellule
<apoptosi: crescita cellulare incontrollata

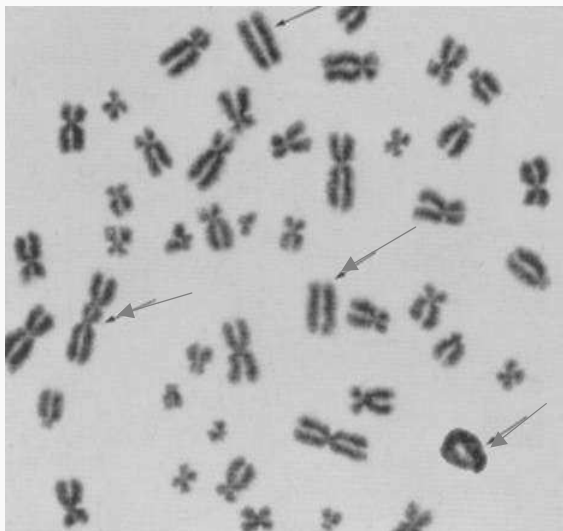
Attività caspasica
Frammentazione del DNA
Esternalizzazione dei residui di fosfatidilserina
Perdita del PMM
Espressione genica



Danno alla molecola di DNA

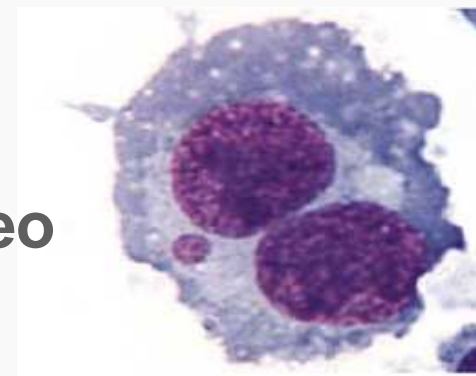


Citogenetica classica

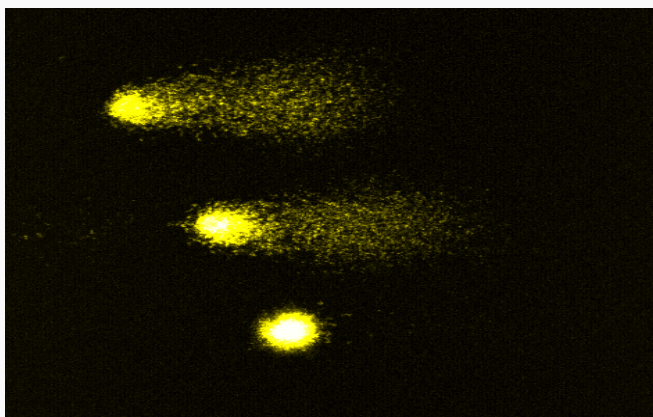


Aberrazioni cromosomiche

Test del micronucleo



citogenetica molecolare



Test della cometa



Novara, 6 - 8 giugno 2012

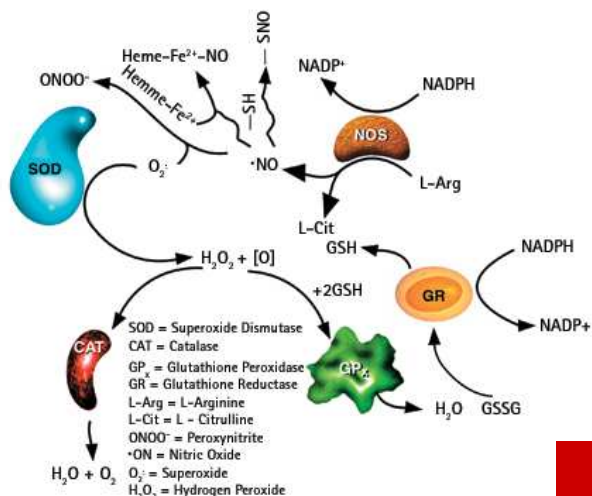
STRESS OSSIDATIVO

Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

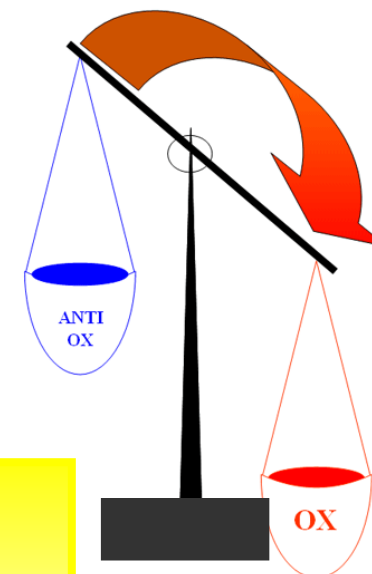
specie con uno o più elettroni spaiati ➡ elevata reattività chimica

ROS } [basse]: metabolismo
 [alte]: stress ossidativo

Il mantenimento della [ROS] entro i limiti fisiologici è assicurato da reazioni enzimatiche e non enzimatiche



ROS
GSH
G6PD
SOD
CAT
GRed
GPx



Novara, 6 - 8 giugno 2012

RISULTATI

Apoptosi

nessun effetto delle RF in cellule normali; sporadiche evidenze in cellule tumorali e di interazione RF-apoptogeni

Proliferazione

**risultati contrastanti
(incremento/decremento)**

Espressione genica e di proteine correlate alla cancerogenesi

**Svariate evidenze di effetto,
spesso non confermate e non
supportate da altre analisi
correlate**

Stress ossidativo

pochi studi



istituto per il rilevamento
elettromagnetico
dell'ambiente

RADIATION RESEARCH 169, 561–574 (2008)

0033-7587/08 \$15.00

© 2008 by Radiation Research Society.

All rights of reproduction in any form reserved.

Danno diretto al DNA

Genetic Damage in Mammalian Somatic Cells Exposed to Radiofrequency Radiation: A Meta-analysis of Data from 63 Publications (1990–2005)

Vijayalaxmi^{a,1} and Thomas J. Prihoda^b

Dal 2005 a tutt'oggi: più di 20 articoli

Endpoints: SSB/DSB; SCE; CA; MN

Quality of Publications

The quality of publications increased from 2% during 1990–1995 to 48% during 2001–2005, indicating a substantial improvement in the quality of publications during recent years

Novara, 6 - 8 giugno 2012

Danno al DNA / esperimenti ripetuti

Lai & Singh 1995

2.45 GHz (CW, PW) 0.6 e 1.2 W/kg per 2h
Neuroni di ratto/comete



Malyapa et al., 1997;98
Lagroye et al., 2004

Maes et al., 1996

900 MHz GSM, 2h, 1.5W/kg
HPBL/SCE; effetti cooperativi con MMC



Maes et al., 1997; 98; 2001
Stronati et al., 2006

Phillips et al., 1998

800-900 MHz GSM, 2, 3, 21h, 2.4 & 26 mW/kg
Molt-4/comete (+, -)



Hook et al., 2004

Tice et al., 2002

900-1800 MHz GSM, 3 & 24h, 1,5,10 W/kg
HPBL/MN e comete



Vijayalaxmi et al., 2001
McNamee et al., 2002, 03
Scarfì et al., 2006

Diem et al., 2005

1800 MHz GSM, 4, 16 & 24h, 2 W/kg
Fibroblasti/MN e comete



Speit et al., 2007

RF & children

Differente risposta nei giovani rispetto agli adulti?

- ➔ maggior assorbimento di energia a RF dei tessuti della testa (Christ and Kuster, 2005; Wiart et al., 2008)
- ➔ tempi di esposizione più lunghi (effetto cumulativo) (Vecchia, 2005)
- ➔ sviluppo e maturazione del sistema nervoso, immunitario e di altri organi critici (Stewart Committee, IEGMP, 2000)

COST BM0704 – Emerging technologies WG 4 - Biology

RF & children

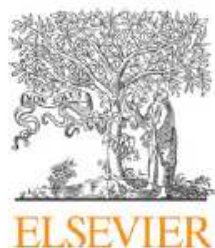
Nell'insieme, non c'è evidenza di effetti:

In vitro (cellule embrionali normali e tumorali, umane e animali)

- nessuna variazione dell'espressione di geni e proteine in 9 studi/15;
- assenza di effetti nella maggior parte degli studi sugli effetti genotossici (13);
- nessun effetto sull'apoptosi (8 studi) e sullo stress ossidativo (3 studi);
- nessun effetto cooperativo in 5 studi/8

In vivo (animali con esposizioni prenatali o postnatali)

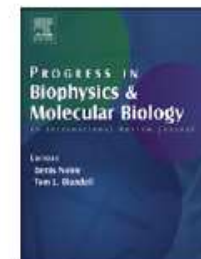
- Studi limitati sia per i segnali usati sia per gli endpoint esaminati



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Progress in Biophysics and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pbiomolbio



Review

Are the young more sensitive than adults to the effects of radiofrequency fields?
An examination of relevant data from cellular and animal studies[☆]

Carmela Marino^{a,*}, Isabelle Lagroye^b, Maria Rosaria Scarfi^c, Zenon Sienkiewicz^d

^aUnit of Radiation Biology and Human Health, ENEA, Casaccia Research Centre, Rome, Italy

^bEPHE Bioelectromagnetics Laboratory/IMS Laboratory, Pessac, France

^cCNR Institute for Electromagnetic Sensing of Environment, Naples, Italy

^dHealth Protection Agency, Chilton, Oxfordshire, UK

**Le informazioni disponibili sono insufficienti per
asserire che il sistema nervoso dei giovani è più
sensibili di quello degli adulti alle esposizioni a RF**

Novara, 6 - 8 giugno 2012

IARC Classification of Radiofrequency Electromagnetic Fields (IARC Monographs Series, Vol. 102)

Group 1: "Carcinogenic to humans" There is enough evidence to conclude that it can cause cancer in humans.

Group 2A: "Probably carcinogenic to humans" There is strong evidence that it can cause cancer in humans, but not sufficient evidence in humans.

Definizione IARC :

Categoria di agenti per i quali c'è una limitata evidenza di cancerogenesi nell'uomo e una insufficiente evidenza di cancerogenesi negli animali da esperimento

Group 4: "Probably not carcinogenic to humans" There is strong evidence that it does not cause cancer in humans.

Associazione positiva per gliomi in utilizzatori di telefoni cellulari da più di 7 anni. Risultati simili per il neurinoma acustico ma su un numero minore di casi

Altre sorgenti = nuovi segnali

➤ UMTS e ulteriori generazioni



➤ WiFi e altri networks wireless



➤ UWB

Le conoscenze acquisite a tutt'oggi possono essere trasferite a qualunque segnale?

Open questions



Effetti cooperativi

ICNIRP (2009)

IARC (2012)

WHO (2015)



Nuove tecnologie wireless



Esposizioni multiple

Novara, 6 - 8 giugno 2012

RISPOSTA ADATTATIVA

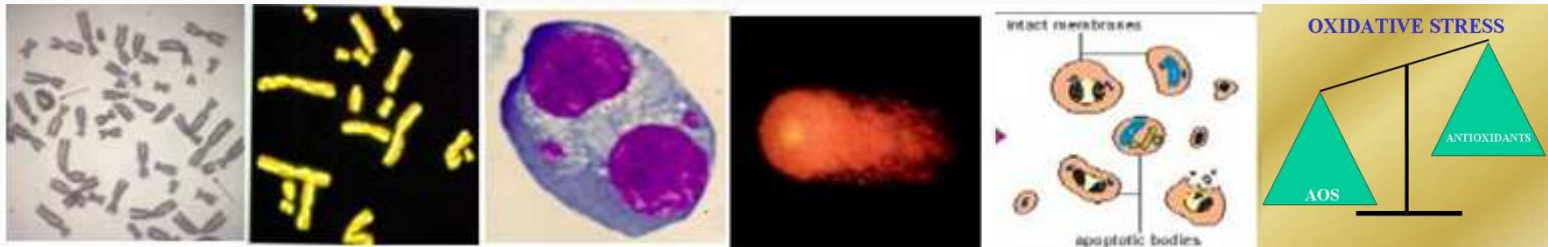
Capacità di una dose estremamente bassa di un **agente mutageno** fisico o chimico (dose adattante) di ridurre l'effetto di un successivo trattamento a dosi maggiori dello stesso agente o di un agente diverso (dose challenge)

Ben documentata in radiobiologia *in vitro* & *in vivo*

E. Coli, cellule di mammifero e vegetali, roditori, lavoratori

Agenti induttori – radiazioni ionizzanti & mutageni chimici

Endpoints



**La maggior parte degli studi in letteratura è stata
eseguita impiegando radiazioni ionizzanti come AD
e/o CD per indurre RA**

nel nostro laboratorio

Campi a RF per determinare se radiazioni non
ionizzanti sono in grado di indurre risposta
adattativa in linfociti umani da sangue periferico

Induzione di AR valutata come danno al DNA applicando
il **test del micronucleo** (MN) col blocco della citodieresi

Protocollo Sperimentale

Colture da 3 ml (sangue periferico da donatori sani)

Esposizioni a RF (20 h) come dose adattante (AD)

MMC (100 ng/ml) come dose challenge (CD)

Controlli positivi: colture trattate con MMC sia come AD (1 ng/ml)
sia come CD (100 ng/ml)

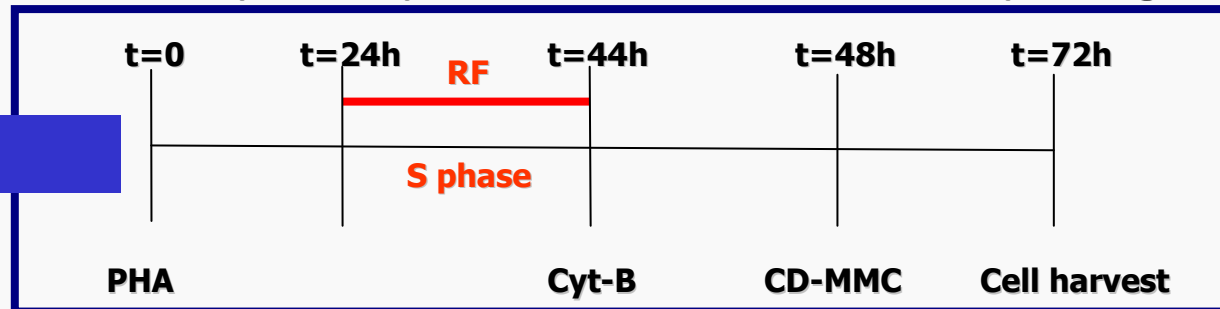
➤ **Controllo**

- 1 ng/ml MMC a 24h (AD)
- 100 ng/ml MMC a 48h (CD)
- 1+100 ng/ml MMC (AD+CD)

➤ **Sham**

- RF (AD)
- Sham + MMC (100 ng/ml) (CD)
- RF + MMC (100 ng/ml) (AD+CD)

20h in fase S



Frequenza di MN su 2000 cellule/trattamento

Novara, 6 - 8 giugno 2012

Attività sperimentale

I° studio – valutazione dell'induzione di RA in seguito a esposizioni a 900 MHz, GSM, SAR 1.25 W/kg in fase S del ciclo cellulare

II° studio – ruolo della fase del ciclo cellulare dell'induzione di Risposta Adattativa da RF

III° studio – valutazione della dipendenza dai parametri elettromagnetici nell'induzione di RA da RF

IV° studio – valutazione della dipendenza dal meccanismo di azione dell'agente challenge nell'induzione di RA da RF

In corso di svolgimento – *valutazione della dipendenza dal tipo cellulare e meccanismo di azione coinvolto nella RA da RF*



20h di esposizione (900 MHz, GSM, SAR 1.25 W/kg)

- ✓ assenza di effetti genotossici e citotossici in linfociti umani

Produzione di un “trigger” in grado di indurre RA: protezione da un successivo trattamento con una dose challenge di un agente genotossico (MMC)

RADIATION RESEARCH 171, 735–742 (2009)
0033-7587/09 \$15.00
© 2009 by Radiation Research Society.
All rights of reproduction in any form reserved.

Induction of Adaptive Response in Human Blood Lymphocytes Exposed to Radiofrequency Radiation

Anna Sannino,^a Maurizio Sarti,^a Siddharth B. Reddy,^a Thomas J. Prihoda,^b Vijayalaxmi^c and Maria Rosaria Scarfi^{a,1}

^a CNR-Institute for Electromagnetic Sensing of Environment, Napoli, Italy; ^b Department of Pathology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas 78229; and ^c Department of Radiation Oncology, University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas 78229

- ➔ Significativo decremento del danno indotto da MMC (adattamento) in cellule esposte a RF in fase S (24-44h)
- ➔ Nessun effetto della RF in fase G_0 (prima della stimolazione) o G_1 (da 4 a 24 h dalla stimolazione)
- ➔ Nessun effetto della sola esposizione a RF

Int. J. Radiat. Biol., 2011, Early Online, pp. 1–8

informa
healthcare

Induction of adaptive response in human blood lymphocytes exposed to 900 MHz radiofrequency fields: Influence of cell cycle

ANNA SANNINO^{1,2}, OLGA ZENI¹, MAURIZIO SARTI¹, STEFANIA ROMEO^{1,3},
SIDDHARTH B. REDDY⁴, MARIA ANTONIETTA BELISARIO², THOMAS J. PRIHODA⁵,
VIJAYALAXMI⁴, & MARIA ROSARIA SCARFÌ¹

¹Interuniversity Centre for Interaction Between Electromagnetic Fields and Biosystems (ICEmB) at CNR-Institute for Electromagnetic Sensing of Environment, Naples, Italy, ²Department of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, University of Salerno, Salerno, Italy, ³Department of Information Engineering, Second University of Naples, Aversa, Italy, and Departments of ⁴Radiology and ⁵Pathology, University of Texas Health Science Centre, San Antonio, Texas, USA

20h di esposizione a RF (1950 MHz, modulazione UMTS)

- nessun effetto della sola RF;
- induzione di AR – protezione da un successivo trattamento con MMC;
- effetto dipendente dal SAR;
- effetto simile a quello osservato in linfociti esposti a 900 MHz (GSM)

G Model
MUTGEN-402177; No. of Pages 7

ARTICLE IN PRESS

Mutation Research xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect
**Mutation Research/Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis**
journal homepage: www.elsevier.com/locate/gentox
Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Induction of an adaptive response in human blood lymphocytes exposed to radiofrequency fields: Influence of the universal mobile telecommunication system (UMTS) signal and the specific absorption rate

Olga Zeni^a, Anna Sannino^{a,b}, Stefania Romeo^{a,c}, Rita Massa^{a,d}, Maurizio Sarti^{a,1},
Abishek B. Reddy^e, Thomas J. Prihoda^f, Vijayalaxmi^e, Maria Rosaria Scarfi^{a,*}

Novara, 6 - 8 giugno 2012

- ➡ **Nessun effetto della sola RF**
- ➡ **L'esposizione a RF induce un significativo decremento del danno indotto da 1.5 Gy di RX**
- ➡ **Nessun effetto sul danno indotto da dosi minori (1 Gy)**

Risultati ottenuti da colture di linfociti da quattro donatori

Progetto INFN – ARCAICA (2010 -2011)

CNR – IREA & Dipartimento di Scienze Fisiche, Università Federico II

(G Gialanella, GF Grossi, L Manti, P Scampoli)

Manoscritto in corso di stesura

CONCLUSIONI

La caratterizzazione di RA da RF potrebbe aprire nuove prospettive verso l'uso delle radiazioni non ionizzanti per la **protezione dell'uomo dall'azione genotossica di trattamenti per scopi diagnostici** (rischio di trasformazione cellulare dovuto alle conseguenze di esposizioni protratte a basse dosi di RI)

La resistenza indotta da pre-esposizioni a RF da comuni sorgenti quali i telefoni cellulari potrebbe **interferire con la risposta a successivi trattamenti terapeutici**