



SCUOLA DI DOTTORATO IN BIOLOGIA ANIMALE
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA ANIMALE E DELL'UOMO
UNIVERSITÀ DI ROMA "LA SAPIENZA"
XVII CICLO
(2001 - 2004)



EFFETTI BIOLOGICI RILEVATI SU
RODITORI ESPOSTI A CAMPI MAGNETICI

PhD Dissertation

BIOLOGICAL EFFECTS INDUCED BY MAGNETIC
FIELD EXPOSURE IN RODENTS



Giorgia Chiuchiarelli

Roma, 2005

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	7
1.1 LA GENOTOSSICITÀ	9
1.2 LO STRESS OSSIDATIVO	10
1.3 AGENTI CHIMICI E FISICI CHE POSSONO CAUSARE DANNO AL DNA MEDIATO DALLA FORMAZIONE DI RADICALI LIBERI	11
1.4 CAMPO ELETTRICO	12
1.5 CAMPO MAGNETICO	13
1.6 CAMPO MAGNETICO PRODOTTO DA UN SOLENOIDE	13
1.7 ONDE ELETTROMAGNETICHE	15
1.8 METODI DI INTERAZIONE E LORO EFFETTI	17
1.9 COMET ASSAY	32
1.10 OBIETTIVO DELLA RICERCA	39
2. MATERIALI E METODI	41
2.1 SISTEMI BIOLOGICI UTILIZZATI	41
2.1.1 <i>Linfociti umani (in vitro)</i>	41
2.1.2 <i>Topi Swiss CDI (in vivo)</i>	42
2.2 TRATTAMENTO	43
2.2.1 <i>H₂O₂, estrogeno, progesterone</i>	43
2.2.2 <i>Campo elettromagnetico</i>	43
2.3 METODICHE UTILIZZATE	46
2.3.1 <i>Comet assay su linfociti</i>	46
2.3.2 <i>Comet assay su cervello e sangue</i>	47
2.4 ANALISI DI IMMAGINE	50
2.5 PARAMETRI ANALIZZATI	51
2.6 ANALISI STATISTICA	53

3. RISULTATI	55
3.1 CERVELLO	55
3.1.1 <i>Cervello adulti</i>	55
3.1.2 <i>Cervello neonati</i>	65
3.1.3 <i>Incremento proporzionale</i>	74
3.2 SANGUE	77
3.2.1 <i>Sangue adulti</i>	77
3.2.2 <i>Sangue neonati</i>	87
3.2.3 <i>Incremento proporzionale</i>	97
3.3 LINFOCITI UMANI	100
3.3.1 <i>Curve dose-risposta</i>	100
3.3.2 <i>Catalasi</i>	106
4. DISCUSSIONE	113
5. CONCLUSIONI	121
6. BIBLIOGRAFIA	123
<i>Siti Internet</i>	139
7. APPENDICE	141
<i>Grandezze ed unità di misura</i>	
8. RINGRAZIAMENTI	143
8.1 PUBBLICAZIONI E POSTER CONGRESSUALI	144

RIASSUNTO

Effetti biologici su roditori esposti a campi magnetici.

Dalla prima metà dell'Ottocento l'utilizzo dei campi elettromagnetici è andato aumentando ed oggi lo ritroviamo fortemente presente nel campo industriale e delle telecomunicazioni (telefoni cellulari, radionavigazione, radar), ma anche nelle nostre case (elettrodomestici, computer) e nei macchinari usati per scopi diagnostici e terapeutici. Di conseguenza è sorto il problema della tollerabilità da parte dell'uomo e degli altri esseri viventi e della loro sicurezza. I campi elettromagnetici, infatti, interagiscono con la materia vivente tramite molteplici meccanismi, alcuni noti, come quello termico, altri tuttora poco chiari come le interazioni a bassa frequenza. Alle frequenze più basse (50-60 Hz), infatti, prevalgono effetti non termici come l'orientamento delle cellule e le modificazioni nel comportamento delle membrane eccitabili, come quelle di nervi e muscoli. Questo tipo di campo elettromagnetico a bassa frequenza (ELF) ha come sorgenti oggetti a noi molto vicini: impianti di trasformazione e linee di trasmissione elettrica, trasmettitori radio (FM) e televisivi (UHF), stazioni radio base (GSM), elettrodomestici, altiforni, fonderie, videoterminali, apparecchiature per il trattamento del legno, per la marconiterapia e la radioterapia.

L'esposizione a campi magnetici "ELF" è stata correlata con l'incidenza del cancro, compreso quello ai polmoni e al cervello, ma, soprattutto, della leucemia infantile e una maggior incidenza di gravi malattie neurologiche, quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica, è stata riscontrata in lavoratori esposti. Alcune ricerche hanno anche suggerito l'esistenza di una possibile associazione tra esposizione ai campi magnetici "ELF" ed effetti non neoplastici, tra cui sindromi depressive, disturbi cardiaci, cefalee e tendenze al suicidio. Per definire le proprietà genotossiche dei campi elettromagnetici sono stati analizzati campi "ELF" a differenti frequenze e intensità, comprendendo le microonde e le radiofrequenze, ma anche campi magnetici ed elettrici statici; sono stati fatti variare anche i tempi di esposizione, da quelle puntiformi (poche ore) a esposizioni croniche (diversi giorni). Si sono condotti studi *in vitro* a livello cellulare, molecolare e genetico, e *in vivo* su vertebrati, invertebrati, vegetali e batteri e anche in sistemi acellulari. I meccanismi di interazione delle onde elettromagnetiche con l'organismo vivente, però, non sono ancora stati chiariti. La mancanza di questo anello di congiunzione tra causa ed effetto lascia aperto il campo a più approfondite ricerche.

Pertanto, obiettivo di questo lavoro è stato quello di analizzare, in popolazioni cellulari distinte, gli eventuali danni genotossici dovuti all'esposizione a lungo termine, *in vivo*, a campi magnetici di intensità 0,65 mT e frequenza 50 Hz vicine a quelle che si possono ritrovare in ambiente domestico e lavorativo. Si è scelto di utilizzare il *Comet assay* per analizzare gli effetti biologici su sangue periferico e tessuto cerebrale di topi di laboratorio. Il *Comet* è un test di genotossicità

estremamente sensibile e in grado di analizzare il danno al DNA, indotto da sostanze mutagene, a livello di singole cellule di qualunque tipo di tessuto pur se in piccole quantità. Si è esaminato un danno di tipo genotossico perché esso potrebbe essere il primo stadio verso la trasformazione della cellula danneggiata in cellula tumorale. Ciò risulta estremamente importante se si considera quanto emerge da alcuni studi epidemiologici i cui risultati, come precedentemente accennato, sembrano indicare una relazione causale fra l'esposizione a campi elettromagnetici ELF e l'insorgere, nella popolazione esposta, di leucemie, soprattutto infantili, e tumori al cervello.

Topi Swiss CD1 sono stati esposti a campi magnetici prodotti da solenoidi. Maschi e femmine gravide sono stati collocati all'interno di un solenoide ed esposti per 23 giorni e i neonati per le successive 72 ore. I topi di controllo sono stati posti nello stesso ambiente in solenoidi non attivi. Tail Moment (TM), percentuale di DNA nella coda (%DNA) e Tail Length (TL) sono stati scelti come parametri per misurare il danno al DNA nel *Comet assay*. Dall'analisi dei risultati ottenuti emerge che l'esposizione a campi magnetici induce un danno al DNA delle cellule del tessuto cerebrale di topi adulti e neonati significativamente più elevato negli esposti rispetto ai controlli. Inoltre il confronto fra i due gruppi mette in evidenza che, benché il danno sia sempre maggiore negli adulti che nei neonati, in questi ultimi esso è quadruplicato in seguito all'esposizione, mentre è raddoppiato negli adulti. Questo fa supporre una maggiore sensibilità agli effetti dell'esposizione dei neonati rispetto agli adulti. I risultati ottenuti nel sangue mostrano che i valori medi di TM, %DNA, e TL risultano sempre più elevati nel gruppo di controllo sia nei topi neonati che negli adulti. La risposta ottenuta nel sangue è, quindi, di difficile interpretazione, anche se un danno minore nel gruppo esposto rispetto al controllo è tipico, nel *Comet assay*, quando siano presenti *crosslinks* nel DNA. Risultati di recenti studi spingono, inoltre, a ritenere che lo ione Fe^{2+} giochi un ruolo importante nel meccanismo d'azione dei campi magnetici catalizzando la reazione di Fenton e innescando una cascata di eventi che, in ultima analisi, porterebbe alla formazione del radicale idrossilico, responsabile del danno al DNA rilevato a seguito dell'esposizione. Nel sangue l'effetto dei campi magnetici sarebbe decisamente meno forte che non in altri tessuti grazie alla proprietà antiossidante del plasma legata principalmente alla presenza della transferrina, un potente chelante del ferro, e della ceruloplasmina, un suo ossidante, il che potrebbe spiegare la risposta ottenuta nel sangue.

In conclusione, questo studio mette in evidenza un effetto dannoso dell'esposizione prolungata a campi magnetici di intensità di 0,65 mT e frequenza 50 Hz in cellule di cervello di topi adulti e neonati. Questi risultati richiedono successive conferme e sono in corso ulteriori studi per approfondire le conseguenze dell'esposizione anche su altri organi bersaglio, in modo da poter fornire uno spettro più ampio possibile di informazioni utili alla salvaguardia delle popolazioni umane.

ABSTRACT

Biological effect induced on rodents by magnetic field exposure

During the first half of the XVII century, engineers promoted the industrial use of electromagnetic energy following the discovery of electromagnetism. Since then, the use of electromagnetic fields has steadily increased industry and telecommunications (mobile phones, radio-navigation, radar), at home (electrical household appliances, computers) and in devices for health assessment. Therefore, concern has arisen with regards to security and tolerance in humans.

The exposure to ELF magnetic fields has been correlated with cancer induction, including breast and brain cancer, but overall, with leukaemia in children. A major incidence of neurological diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and amyotrophic lateral sclerosis has been shown in exposed workers. Several studies have already suggested a possible association between ELF magnetic fields and non-neoplastic effects together with cardiac disorders, headaches, depression syndromes and suicide tendencies. In order to define the genotoxic potential of electromagnetic fields, different frequencies and intensities have been analysed. *In vitro* studies have been conducted at the cellular, molecular and genetic levels and in non-cellular systems. *In vivo* studies have been carried out in vertebrates, non-vertebrates, plants and bacteria. Taken together, so far the studies have not fully clarified the mechanisms of interaction among electromagnetic waves and living organisms. However, suggestions exist about the genotoxic potential of the magnetic field.

As genotoxic damage can be a first step for carcinogenesis, the goal of this thesis has been to evaluate the exposure effects to electromagnetic fields in laboratory mice

The current *in vivo* investigation assesses the potential genotoxic damage induced by long-term exposure to magnetic fields in two cell types (whole blood and brain cells) of laboratory mice measured with the *Comet assay*. The experiment was performed at 50 Hz. The features of the magnetic fields selected (0,65 mT) are in the range of those found in the working and domestic environment. The alkaline *Comet assay* reveals DNA damage generated by single strand breaks, double strand breaks and/or alkali labile sites caused by genotoxic insults. It is a rapid and highly sensitive assay when compared with other well known genotoxic techniques (micronuclei, chromosome aberrations, SCE, etc.). Moreover, it allows all types of cells/tissues to be analysed. The magnetic field was produced by solenoids (80 cm length, 25 cm diameter, 552 coils (690 coils/m), 3 Ω resistance of copper wire, 5-6 V supply).

Swiss CD-1 male and female mice, two months old, and pregnant females, four months old, were placed in the centre of the solenoids and were exposed for 22-23 days, 24 hours per day. Newborns were kept in the solenoids for 72 h after birth together with the mothers. Control mice were placed in the same environment (exposure room) as the exposed mice although solenoids were switched off. The room was maintained at a temperature of 23 ± 1 °C, and humidity of $45 \pm 5\%$. A time-controlled system provided a daily 08-16 light and 16-08 dark cycle. Food and tap water were available *ad libitum*. At the end of the exposure, animals were sacrificed and brain and whole blood were collected within 24 h.

After removal, brain was washed in PBS and cut in little pieces. Tissue pieces were then dispersed into single-cell suspension using a pipette. The blood and brain suspensions were processed in the same manner in the *Comet assay*.

Cells were embedded in low-melting-point agarose on a microscope slide. The cells were lysed in a lysis buffer and electrophoresed in a highly alkaline (pH>13) condition. After staining, slides were scored on a fluorescence microscope connected to a computer. Images of comets were analysed with appropriate image analysis software. Tail Moment, %DNA in the tail and Tail Length were the parameters selected to evaluate DNA damage in the *Comet assay*. Furthermore, treatment with proteinase K was performed in order to assess the presence of crosslink in the DNA.

The results obtained showed that exposure to electromagnetic fields cause DNA damage in the brain cells of adult (Figg. 13, 14) and newborn (Figg. 21, 22) mice, such damage being significantly higher than in control groups. In addition, even though basal levels of DNA damage were higher in adults than in new-borns, the increase of damage due to exposure was higher in new-born mice (Figg. 26, 27, 28). DNA damage in the brain cells of young mice after exposure was 4-fold higher than controls, whereas it was 2-fold higher in the adult group. No evidence of cross-links in brain cells following exposure was found in new-born or adult mice.

The results obtained in peripheral blood showed that the mean values of TM, % DNA and TL were higher in control groups than in the exposed, both in adult (Figg. 32, 33) and in young (Figg. 40, 41) mice. These results are difficult to explain. Bearing in mind that higher levels of DNA damage in the control group could suggest a mechanism of DNA cross-linking, these results have to be considered as controversial, even considering results from proteinase K treatment. In fact, in new-born mice the TM, %DNA and TL values of exposed group treated with proteinase K were significantly higher than in non-treated exposed group, but this was not observed in adults.

Recent studies lead to the consideration that Fe^{2+} ions play an important role in the biological effects of magnetic fields. Fe^{2+} catalyses the Fenton reaction and triggers a cascade of secondary

events that, in a second step, lead to an increase of nitric oxide synthesis. The latter one may be responsible for DNA damage revealed after exposure. The properties of blood are known as a buffer, thereby, quenching a variety of insults. Normal human plasma contains high and low molecular mass redox-active molecules, such as transferrin and caeruloplasmin, that offer considerable protection against organic and inorganic oxygen radicals generated by ions. Such features of blood may explain the lack of responses found after exposure.

In conclusion, this study highlights harmful genotoxic effects in brain cells of both adult and new-born mice due to long exposure to magnetic fields of 0,65 mT intensity (50 Hz frequency). Nevertheless, the results obtained in this investigation require further research to enhance its consistency. Studies should be performed to assess the biological consequences after exposure in other target organs. A wider variety of endpoints will allow a better understanding of the effects of magnetic fields in living organisms, as well as provide a more accurate and reliable data in terms of risk assessment for humans.

As a model of oxidative stress, the *Comet assay* was also used to investigate the effect of hydrogen peroxide, oestrogen and progesterone on blood lymphocytes from vitiligo patients (treated and untreated) and healthy donors in presence and absence of catalase. Dose-response curves were obtained for the three compounds used (Figg. 48, 49, 50). Statistically significant difference result when DNA damage in the control group was compared with different doses of H₂O₂ on lymphocytes from treated vitiligo patients and healthy donors. Oestrogen and progesterone, at the higher doses used, damage DNA in both control and vitiligo treated and untreated groups. Results also confirmed the capacity of H₂O₂ to induced severe DNA damage in lymphocytes from the control group and treated vitiligo group in a dose-dependent manner. Catalase abolished DNA damage induced by hydrogen peroxide and oestrogen in lymphocytes from healthy donors and treated vitiligo patients but not in lymphocytes from untreated vitiligo patients.

This last part of the study was carried out in the Department of Biomedical Science of the University of Bradford (UK) with Prof. D. Anderson and Prof. K. Schallreuter.

1. INTRODUZIONE

L'esistenza di fenomeni magnetici naturali è conosciuta sin dall'antichità, tanto che se ne trova traccia nelle opere di Aristotele, Lucrezio e Plinio, ma è nel Medio Evo che gli studi su di essi cominciano a diversificarsi in due filoni nettamente distinti:

- 1) la ricerca sui fenomeni magnetici, che porta alla scoperta e alla diffusione della bussola e, quindi, allo studio del geomagnetismo
- 2) l'impiego delle calamite nella cura delle malattie, che, anche se in un primo momento fu accompagnato da deformazioni di ordine mistico, consentì di studiare il magnetismo animale giungendo a quel complesso di fenomeni che oggi si chiama biomagnetismo (Oliva 1986).

E' però dalla prima metà dell'ottocento che gli ingegneri, grazie alle invenzioni legate alla scoperta dell'elettromagnetismo, iniziarono ad utilizzare industrialmente l'energia di origine elettromagnetica.

In poco tempo l'ormai primitiva forza vapore venne abbandonata e centrali elettriche sorsero quasi ovunque. Queste realizzazioni, via via più numerose, consentirono la diffusione e un uso sempre maggiore delle diverse forme di energia elettromagnetica.

Dopo la seconda guerra mondiale, la diffusione dell'elettrificazione, l'incremento dei consumi energetici e l'enorme sviluppo delle telecomunicazioni produssero una profonda trasformazione nell'industria, nell'economia e nella vita sociale.

L'utilizzo dei campi elettromagnetici nella vita di tutti i giorni è andato quindi sempre aumentando (Bistolfi 1986), e oggi lo ritroviamo fortemente presente nel campo industriale e delle telecomunicazioni (telefoni cellulari, radionavigazione, radar), ma anche nelle nostre case (elettrodomestici, computer) e nei macchinari usati per scopi diagnostici e terapeutici. E' sorto, quindi, il problema della tollerabilità da parte dell'uomo e degli altri esseri viventi e della loro sicurezza (Grandolfo *et al.* 1983).

Infatti, poiché negli ultimi anni l'uso di diverse forme di elettricità e di tutte le strumentazioni che emettono campi elettromagnetici ha subito un notevole incremento, molti individui sono oramai soggetti ad esposizione, cronica o discontinua, di campi ELF (Extremely-Low-Frequency) di varie intensità e forme (Lai & Singh 1997). Nei paesi industrializzati, alcune categorie di lavoratori e la popolazione in generale, in certe situazioni, si trovano ad essere esposte a livelli di radiazioni elettromagnetiche ed a campi elettrici o magnetici artificiali di intensità media ma comunque superiore di alcuni ordini di grandezza a quella del fondo naturale (Rossi *et al.*, 1999).

Questa situazione solleva in tutto il mondo, non solo negli ambienti scientifici e nelle istituzioni ma anche nell'opinione pubblica, una diffusa preoccupazione ed un vivo allarme per la salute

riguardante i potenziali effetti associati ad una esposizione incontrollata ai diversi campi elettromagnetici. Questo soprattutto da quando in diversi studi epidemiologici è stato suggerito che l'esposizione di tipo occupazionale ma anche residenziale a campi magnetici poteva essere associata ad un più elevato rischio di comparsa, fra i soggetti interessati, di alcuni tipi di cancro, comprese leucemie, tumori al cervello e ai polmoni (Juutilainen *et al.*, 1990; Wrensch *et al.*, 1993; Loomis *et al.*, 1994; Savitz & Loomis 1995). I numerosi studi di laboratorio sia *in vivo* che *in vitro* mirati a chiarire i possibili effetti dell'esposizione a questo tipo di radiazioni non hanno però, finora, portato a risultati certi ed inequivocabilmente accettati. Sono quindi ancora necessari sia verifiche dei risultati fin qui acquisiti attraverso i diversi studi intrapresi sia l'apporto di nuovi dati.

Lo scopo di questo studio è indagare sui possibili effetti biologici provocati da un'esposizione, *in vivo*, a lungo termine a campi magnetici. In particolar modo l'attenzione è stata focalizzata sugli eventuali danni di tipo genotossico rilevabili immediatamente al termine di un'esposizione di topi del ceppo Swiss CD1 a campi magnetici di intensità di 0,65 mT (frequenza 50 Hz) generati da un solenoide.

1.1. La genotossicità

Un agente genotossico chimico o fisico (come possono essere i campi magnetici) è in grado di alterare la struttura, il contenuto informativo o la segregazione del DNA oppure di inibirne, temporaneamente, la replicazione. Agenti mutageni o capaci di interagire in vario modo con il materiale genetico e di indurre una frequenza di mutazioni superiore a quella di mutazione spontanea, sono inclusi fra quelli aventi caratteristiche genotossiche. Per capire l'importanza che queste sostanze possono avere sulla salute degli organismi viventi è bene tenere a mente cosa siano le mutazioni e quali possano essere le loro conseguenze.

Le mutazioni sono cambiamenti occasionali che si verificano raramente nel materiale genetico di una cellula e che vengono trasmessi alla sua discendenza. Esse possono interessare il DNA in diversi modi e possono essere divise in mutazioni geniche o cromosomiche. Le prime consistono in cambiamenti nella sequenza del DNA che possono indurre un'alterazione dell'informazione genetica e dar luogo alla comparsa di un fenotipo mutante. Le mutazioni cromosomiche, invece, possono comportare cambiamenti nel numero di interi assetti cromosomici (poliploidia) o di singoli cromosomi (aneuploidia), nel qual caso si parla di mutazioni cromosomiche numeriche, o nella sequenza del DNA lungo l'asse del cromosoma in seguito ad eventi di rottura (mutazioni cromosomiche strutturali) (Auerbach & Robson 1947, 1951).

Se la mutazione è fissata nella linea germinale (gameti) essa viene trasmessa alla progenie dell'individuo colpito e si può manifestare con conseguenze anche molto gravi (malattie genetiche).

Le mutazioni nelle cellule somatiche, invece, hanno effetto direttamente sull'individuo colpito e la cellula somatica colpita, qualora si replichi, darà luogo ad una progenie di cellule mutate. Queste mutazioni, si manifestano, generalmente, se sono dominanti o se avvengono in un particolare stadio del ciclo cellulare o in alcune parti dell'organismo e possono causare gravi danni alla cellula fino a portarla alla morte. Considerando l'origine clonale del cancro, se le mutazioni avvengono in geni in qualche modo coinvolti nella regolazione della crescita cellulare si può assistere alla trasformazione tumorale della cellula stessa. Durante il processo di oncogenesi, infatti, la cellula acquista funzioni che promuovono la proliferazione cellulare e contemporaneamente ne perde altre che ne impediscono la crescita; questi eventi non sono altro che il risultato di mutazioni somatiche che trasformano protooncogeni in oncogeni o che inattivano geni oncosoppressori (Davidson *et al.*, 2002). E' utile anche ricordare che le mutazioni somatiche rivestono un ruolo importante non solo nell'eziologia di malattie degenerative come il cancro, ma anche nell'arteriosclerosi e in processi come quello dell'invecchiamento.

1.2. Lo stress ossidativo

Il danno ossidativo è probabilmente una delle cause che origina il maggior numero di lesioni al DNA, fra quelle conosciute (Fig.1), come ad esempio rotture a doppia elica (Double Strand Breaks, DSB), a singola elica (Single Strand Breaks, SSB), formazione di siti apurinici e crosslinks ma anche modificazioni di alcune basi come la timina che può essere ossidata formando glicoli di timina o 5-idrossimetiluracile (Cadet & Berger 1985; Teoule 1987).

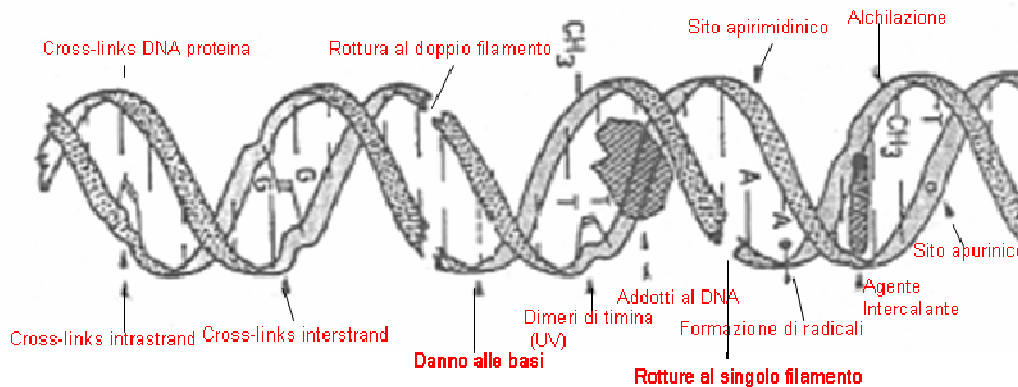


Fig. 1: Alcune delle più frequenti lesioni al DNA prodotte da agenti genotossici (modificata da: Obe & Natarajan 1982).

Fig. 1: Some of the most frequent DNA lesions induced by genotoxic agents (modified from: Obe & Natarajan, 1982).

I responsabili del danno ossidativo sono i radicali liberi che vengono generati spontaneamente durante alcuni processi metabolici ma la cui formazione può anche essere indotta da agenti esogeni.

I radicali sono molecole che, nell'ultimo orbitale molecolare, presentano uno o più elettroni spaiati, il che li rende estremamente instabili e reattivi potendo comportarsi sia da agenti ossidanti, ovvero accettando elettroni, che da agenti riducenti, cedendo elettroni.

Le specie più importanti di radicali liberi sono sicuramente le specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS). Tali forme reattive hanno più elettroni dell'ossigeno molecolare dal quale provengono ed includono radicali superossidi (O_2^{\bullet}), radicali idrossilici (OH^{\bullet}) e perossido di idrogeno (H_2O_2).

Il radicale superossido è molto meno reattivo di altri radicali liberi ma il suo comportamento chimico dipende fortemente dal mezzo in cui è disciolto. In soluzione acquosa non è molto reattivo e si può comportare come un debole agente ossidante, accettando un elettrone, come ad esempio durante l'ossidazione dell'acido ascorbico. Può anche agire da agente riducente, riducendo, ad esempio, il Fe^{3+} e rigenerando O_2 . Al contrario diventa estremamente reattivo

quando è disciolto in solventi organici anche se non è stato dimostrato, *in vivo*, che possa danneggiare direttamente le membrane.

Il radicale idrossilico è invece uno dei radicali più aggressivi, in grado di reagire con DNA, lipidi, proteine e carboidrati (Baskin & Salem 1997). Può essere generato dalla fissione omolitica delle molecole d'acqua prodotta dalle radiazioni ionizzanti o dalla reazione del perossido di idrogeno con alcuni metalli pesanti, come ferro e rame attraverso la reazione di Fenton nelle normali condizioni fisiologiche (Halliwell & Gutteridge 1990).

Il perossido di idrogeno, infine, è una molecola ubiquitaria e viene prodotta da differenti reazioni enzimatiche incluse quelle catalizzate dalla superossido dismutasi (SOD), ma anche attraverso la respirazione mitocondriale. Sembra che nel plasma sia presente substrato a sufficienza per produrre concentrazioni micromolari di H₂O₂ e che la xantina ossidasi catalizzi la reazione (Lacy *et al.*, 1998). Il perossido di idrogeno si mescola facilmente con l'acqua e diffonde con facilità nel corpo attraversando le membrane cellulari (Gutteridge & Halliwell 2000). E' considerata una specie poco reattiva ma viene rapidamente trasformata in OH• attraverso reazioni catalizzate da metalli che possono cedere elettroni (ad esempio Fe²⁺ nella reazione di Fenton) e dalle radiazioni ultraviolette.

1.3. Agenti chimici e fisici che possono causare danno al DNA mediato dalla formazione di radicali liberi.

Numerose sono le sostanze esogene che possono indurre danno al DNA. Queste possono, in primo luogo, essere divise in agenti chimici e agenti fisici.

Agenti chimici

I mutageni chimici hanno normalmente proprietà elettrofile. Alcuni di loro, come gli analoghi delle basi, gli agenti alchilanti e intercalanti possono reagire direttamente con il DNA. Altre sostanze, dette promutageni, come alcune ammine aromatiche o gli idrocarburi policiclici aromatici, sono sostanze di per sé non reattive ma che, nelle diverse vie metaboliche, possono essere convertite in derivati reattivi. Al gruppo dei mutageni indiretti appartengono, invece quegli agenti chimici in grado di formare specie reattive dell'ossigeno o che interagiscono con la replicazione, la sintesi o il mantenimento della struttura del DNA. Alcuni di questi agenti, come la mitomicina C, sono utilizzati come farmaci antineoplastici.

Agenti fisici

Contrariamente a quanto accade per gli agenti chimici, l'attività di quelli fisici sulla materia vivente è indipendente dal metabolismo o dalla complessità dell'organismo esposto anche se, poi, le conseguenze possono essere distinte difficilmente. Le radiazioni ionizzanti sono tra gli agenti fisici più conosciuti e studiati. Fra queste protoni e raggi α agiscono direttamente sulla

molecola di DNA causando la ionizzazione o l'eccitazione degli atomi che la costituiscono. Altre, come i raggi UV sono i maggiori responsabili della formazione di dimeri di timina e insieme a raggi X e γ possono portare alla formazione di radicali liberi in grado di danneggiare il DNA.

Anche le radiazioni non ionizzanti, come ad esempio i campi magnetici a bassa frequenza, potrebbero in qualche modo interagire, in maniera indiretta sul DNA e danneggiarlo. Ma la mancanza di sicure evidenze sperimentali e le poche certezze sugli eventuali meccanismi d'azione rendono lo studio degli effetti delle radiazioni a basse frequenze necessario e attuale, considerando anche l'interesse che questo argomento ha suscitato negli ultimi anni nell'opinione pubblica. Per comprendere meglio le caratteristiche delle radiazioni a bassa frequenza risulta, a questo punto, utile introdurre alcune grandezze fisiche che sono coinvolte nella definizione di questo tipo di radiazioni.

1.4. Campo elettrico

Il campo elettrico è quella regione di spazio nella quale una carica q è soggetta ad una forza F che agisce su di essa. L'intensità del campo elettrico in un punto, indicata con E ed espressa in Volt per metro (V/m), è definita come il modulo della forza agente su di una carica puntiforme ($E = F/q$) e dipende dalla distanza tra la carica e la sorgente del campo secondo la formula

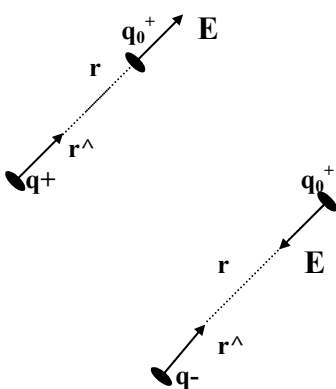
$$E = K q/r^2 r^\wedge$$

K = costante di Coulomb ($8,99 \cdot 10^9 \text{ N} \cdot \text{m}^2\text{C}^2$)

q = carica puntiforme (C)

r = distanza tra carica puntiforme e carica di prova (m)

r^\wedge = versore



1.5. Campo magnetico

Oltre che di un campo elettrico lo spazio che circonda una carica elettrica q in moto è sede di un campo magnetico, infatti Maxwell, alla fine del 1800, dimostrò che un campo elettrico variabile origina un campo magnetico. Analogamente a quanto detto per il campo elettrico, possiamo definire, in un certo punto dello spazio, un vettore campo magnetico (\mathbf{B}), chiamato anche induzione magnetica, come la forza che si esercita su un appropriato oggetto di prova posto nel punto stesso. La direzione e il verso di un campo magnetico (\mathbf{B}) in ogni punto sono quegli stessi dati dal polo nord dell'ago di una bussola ivi posta.

La forza F che agisce sulla carica q è

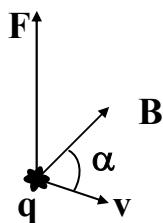
$$F = qv \wedge B = qvB\sin\alpha$$

F = forza magnetica (N)

q = carica puntiforme (m)

v = velocità della particella (m/s)

B = campo magnetico (T)



1.6. Campo magnetico prodotto da un solenoide

Un solenoide è costituito da un lungo filo avvolto su se stesso a formare un'elica a corto passo e percorso da una corrente i . Il passaggio di corrente nel filo (cariche elettriche in moto) fa sì che il solenoide generi un campo magnetico B . Se l'elica formata dal solenoide è molto lunga rispetto al suo diametro, nei punti vicini alla singola spira, l'osservatore non si accorge che il filo è curvato; il filo, da un punto di vista magnetico, si comporta come se fosse rettilineo e le linee del campo magnetico B , dovute a questa singola spira, sono quasi dei cerchi concentrici (Fig. 2b).

Il campo magnetico generato dal solenoide è, in ultima analisi, la somma vettoriale dei campi creati dalle singole spire che lo costituiscono (il campo tra i fili tende ad annullarsi - Fig. 2c). In punti interni al solenoide e sufficientemente lontani dai fili, B è parallelo all'asse del solenoide.

In punti (P) esterni al solenoide (Fig. 2a) il campo creato dalla parte superiore delle spire tende ad annullare quello creato dalla parte inferiore delle stesse in quanto diretto in senso opposto. In un solenoide ideale il campo magnetico B , in punti esterni al solenoide, tende a zero. Anche in un solenoide reale, purché di lunghezza molto maggiore del diametro, non è azzardato considerare nullo il campo esterno, quando lo si confronti con quello misurato in punti interni

nella regione centrale del solenoide, cioè lontani dagli estremi, in quanto il primo risulterà molto più debole del campo interno.

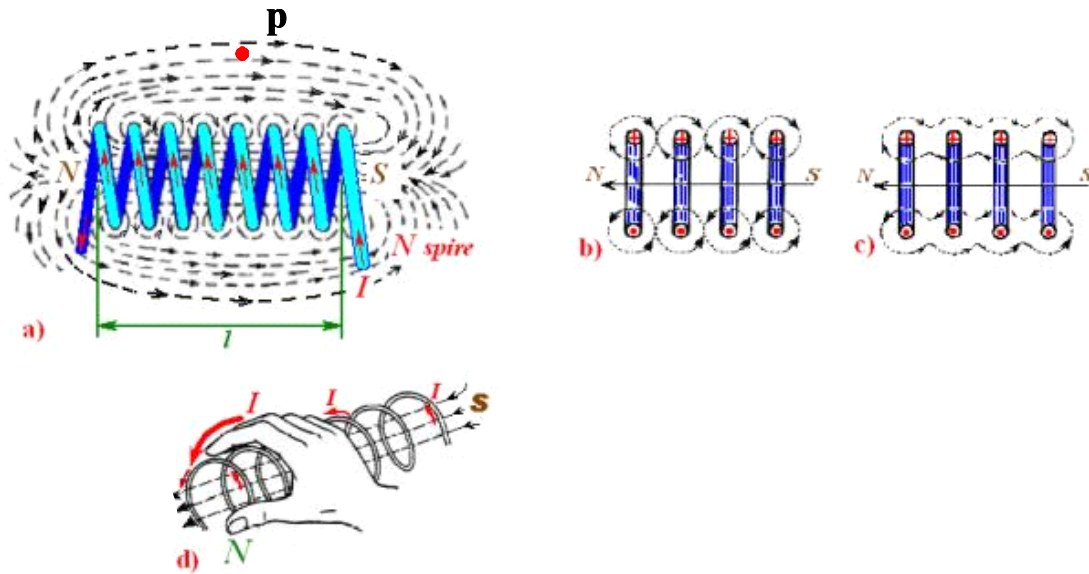


Fig. 2: a) Campo magnetico prodotto da un solenoide: le linee escono dal nord per rientrare, esternamente, nel sud; b) alcune linee di campo, dovute alle singole spire, che si compensano in parte e originano l'andamento risultante in c); d): regola della mano destra in cui il pollice dà il verso del campo.

Fig. 2: a) Magnetic field produced by a solenoid: the field lines go out from the north pole and enter in the south pole; b) some of the field line produced by the single coils that partially compensate each other (balance) and generate the trend described in c); d): right hand rule: the thumb points at the field direction.

Applicando il teorema di Ampere ($\oint \mathbf{B} \cdot d\mathbf{l} = \mu_0 i$) si può dimostrare che, nel caso si consideri un circuito rettangolare abcd (Fig. 3) in un solenoide ideale, $\oint \mathbf{B} \cdot d\mathbf{l}$ calcolato sull'intero percorso

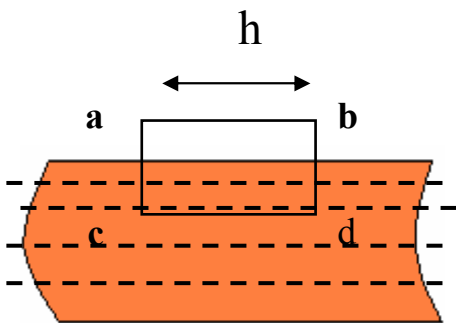


Fig. 3: Sezione di un solenoide ideale e percorso di integrazione per il calcolo del flusso magnetico.

Fig. 3: Section of an ideal solenoid and integral pathway used to calculate the magnetic flux.

rettangolare, vale Bh . La corrente totale i che attraversa la superficie limitata dal percorso di integrazione non è uguale alla corrente i_0 che passa nel solenoide, perché il cammino di integrazione racchiude più di una spira. Indicando con n il numero di spire per unità di lunghezza si ha $i = i_0(nh)$. Il teorema di Ampere diviene allora $Bh = \mu_0 i_0 nh$ da cui $B = \mu_0 i_0 n$.

Questa equazione è sufficientemente buona anche nel caso di solenoidi reali per punti interni vicini al centro del solenoide. Essa mostra che l'intensità del campo non dipende dal diametro né dalla lunghezza del solenoide e che B rimane costante in tutti i punti della

sua sezione.

Quindi mediante un solenoide si può creare un campo magnetico uniforme di valore noto.

1.7. Onde elettromagnetiche

Un'onda elettromagnetica è un'onda che si propaga nel vuoto alla velocità della luce. Essa può essere descritta in un diagramma (Fig. 4) come un'onda piana composta da un campo elettrico ed un campo magnetico perpendicolari tra loro e alla direzione di propagazione dell'onda. Se si immagina che l'onda elettromagnetica si propaghi lungo l'asse z, il suo campo magnetico (B) è parallelo all'asse delle ordinate (y) mentre quello elettrico è parallelo all'asse delle ascisse (x).

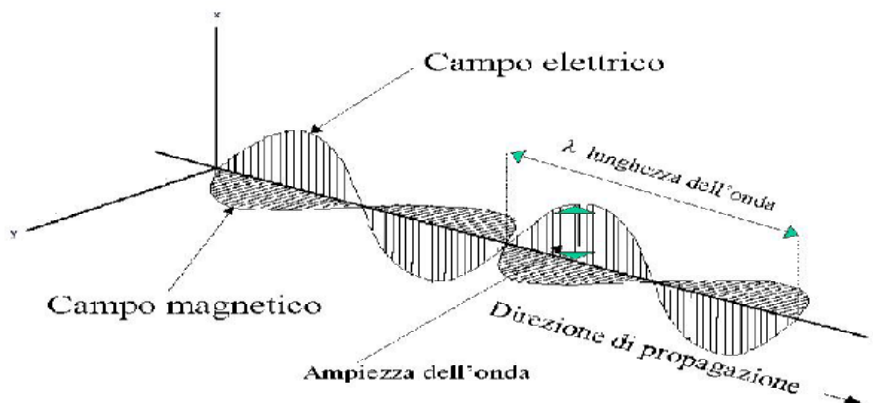


Fig. 4: Onda elettromagnetica di lunghezza d'onda λ che si propaga nel vuoto lungo l'asse z. Il campo elettrico e quello magnetico sono entrambi sinusoidali e perpendicolari tra loro (da: Scalia 2001).

Fig. 4: Electromagnetic wave with wave length equal to λ that travel (is propagated) in the vacuum along the z axis. The electric and magnetic fields are both sinusoidal and perpendicular to each other (from: Scalia 2001)

Per un'onda elettromagnetica possiamo definire i seguenti parametri:

- DIREZIONE DI PROPAGAZIONE,
- PERIODO (intervallo di tempo compreso tra il passaggio di due creste consecutive dell'onda per uno stesso punto),
- FREQUENZA (numero di oscillazioni compiute nell'unità di tempo. E' l'inverso del periodo),
- LUNGHEZZA D'ONDA (distanza orizzontale tra due creste successive)

Poiché tutte le onde elettromagnetiche viaggiano nel vuoto con una velocità (c), la loro frequenza (ν) e la lunghezza d'onda (λ) sono legate dall'importante relazione: $c = \nu \cdot \lambda$.

Le onde elettromagnetiche possono essere classificate in base alla frequenza (Fig. 5) (Rossi *et al.*, 1999):

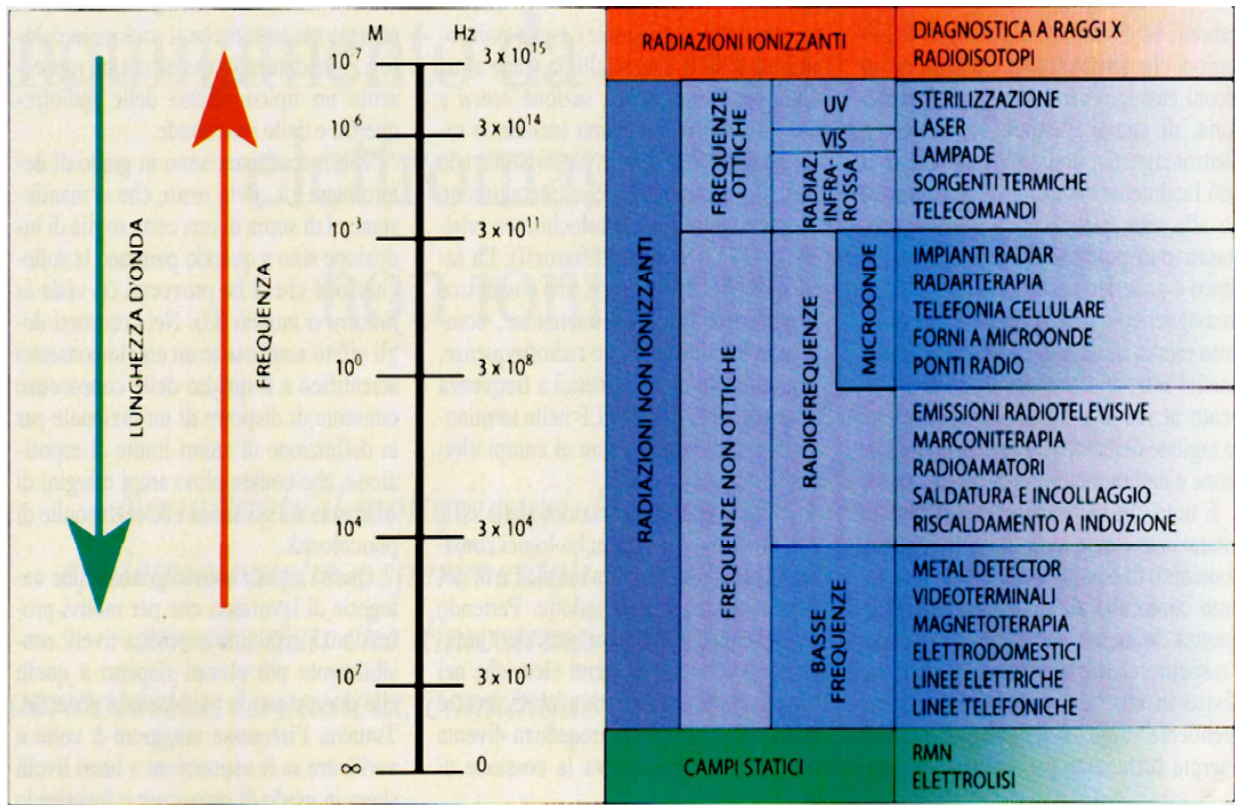


Fig. 5: Lo spettro elettromagnetico. In base alla lunghezza d'onda (λ) e alla frequenza (ν) sono elencati i diversi tipi di radiazione, con a fianco l'indicazione di alcune applicazioni che ne fanno uso. La scala di misura utilizzata non è lineare ma logaritmica: segmenti di uguale lunghezza non rappresentano uguali intervalli di lunghezze d'onda (da Rossi *et al.*, 1999).

Fig. 5: The electromagnetic spectrum. The different kind of radiations are listed according to their wave length (λ) and frequency (ν). Beside are indicated some devices in which the corresponding radiations are used. The unit scale is not linear but logarithmic. segments of equal length do not represent equal space of wave length (from Rossi *et al.*, 1999).

- BASSE FREQUENZE: ($3 \text{ Hz} - 3 \cdot 10^3 \text{ Hz}$) hanno lunghezze d'onda che arrivano fino a 10 Km e sono impiegate da tutti quei conduttori che portano correnti alternate.
- ONDE RADIO: ($3 \cdot 10^3 \text{ Hz} - 3 \cdot 10^8 \text{ Hz}$) hanno lunghezze d'onda comprese tra 10 Km e 10 cm e sono impiegate prevalentemente per trasmissioni di tipo radiofonico e televisivo.
- MICROONDE : ($3 \cdot 10^8 \text{ Hz} - 3 \cdot 10^{11} \text{ Hz}$) hanno lunghezze d'onda che ricadono in un intervallo compreso tra 10 cm e circa 1 mm. Sono utilizzate dai sistemi radar.

- INFRAROSSE: ($3 \cdot 10^{11}$ Hz – $3,8 \cdot 10^{14}$ Hz) hanno lunghezze d'onda che vanno da circa 1 mm a $7 \cdot 10^{-7}$ m (la massima lunghezza d'onda raggiunta dalla luce)
- VISIBILI: ($3,8 \cdot 10^{14}$ Hz – $7,9 \cdot 10^{14}$ Hz) si estendono dalla lunghezza d'onda di $7 \cdot 10^{-7}$ m (colore rosso) a quella di $4 \cdot 10^{-7}$ m (colore violetto)
- ULTRAVIOLETTE: ($7,9 \cdot 10^{14}$ Hz – $7,5 \cdot 10^{16}$ Hz) terminano approssimativamente a 10^{-8} – 10^{-9} m.
- RAGGI X: ($7,5 \cdot 10^{16}$ Hz - $3 \cdot 10^{19}$ Hz) hanno lunghezze d'onda comprese in un intervallo che va da circa 10^{-8} m fino a 10^{-11} m. Vengono prodotti mediante la decelerazione di elettroni di alta energia.
- RAGGI γ : (al di sopra di $3 \cdot 10^{19}$ Hz) sono onde prodotte da nuclei atomici radioattivi. Le lunghezze d'onda sono inferiori a 10^{-12} m.

1.8. Metodi di interazione e loro effetti

I campi elettromagnetici interagiscono con la materia vivente tramite molteplici meccanismi, alcuni noti, come quello termico, altri tuttora poco chiari come le interazioni a bassa intensità (Ridella 1986).

Ad alta intensità l'effetto più importante è la produzione di calore con rialzo termico (effetto termico) ovvero si ha la cessione di energia ai tessuti attraverso il rapido movimento oscillatorio di ioni e molecole d'acqua (effetto Joule) che si traduce in calore e riscaldamento. Alle intensità più basse prevalgono, invece gli effetti non termici come, ad esempio, l'orientamento delle cellule e le modificazioni nel comportamento di membrane eccitabili (Schwan 1986), come quelle di nervi e muscoli. Questi effetti sono anche preponderanti alle basse frequenze. Infatti i campi magnetici a bassa frequenza non riescono a superare la soglia di energia di assorbimento necessaria ad indurre il riscaldamento nei materiali biologici, situazione che invece si verifica facilmente nei casi di esposizione alla Radiofrequenze (RF).

Gli effetti biologici non termici delle interazioni a bassa frequenza sono fortemente condizionati dalle proprietà magnetiche della materia vivente stessa. Infatti, nei sistemi biologici si trovano presenti sostanze, molecole o elementi con intrinseche e diverse proprietà magnetiche.

Ad esempio, nel corpo umano si possono ritrovare strutture con proprietà *ferromagnetiche* cioè in grado di assumere una rilevante magnetizzazione indotta, parallela al campo magnetico induttore, come i magnetosomi nelle strutture ossee della base cranica.

Sostanze *paramagnetiche*, quindi a magnetizzazione indotta assai bassa, con verso concorde al campo induttore, sono presenti, nel corpo umano, sia in strutture cellulari stabili quali metalli (metallo-proteine e metallo-enzimi), citocromi e ossigeno molecolare sia in aggruppamenti molecolari labili, quali i radicali liberi formati nel corso di reazioni metaboliche.

Ma anche le membrane biologiche (presenti dal protoplasma agli organuli cellulari) o macromolecole dotate di anisotropia o coinvolte nello svolgimento di attività enzimatiche hanno proprietà magnetiche seppur deboli (proprietà *diamagnetiche*) e possono andare incontro a magnetizzazione indotta assai bassa, con verso discorde rispetto al campo magnetico induttore. L'anisotropia è stata, per esempio, dimostrata per i bastoncelli della retina e per le molecole di DNA e RNA. Se essa è sufficientemente grande e interessa un gran numero di molecole, può nascere una forza di torsione che sarà proporzionale all'orientamento, alla differenza tra le due diverse suscettività (ortogonali tra loro) e al quadrato del campo magnetico. Quindi, intensità di campo e durata di esposizione diventano fattori essenziali per questo effetto (Bistolfi 1986).

Un altro particolare effetto magnetomeccanico, consistente in modificazioni dell'angolo dei legami covalenti (Popp 1979) e dell'orientamento dei dipoli elettrici (Wolkowski *et al.*, 1979) potrebbe avere una speciale importanza magnetobiologica, quando si pensi alla organizzazione strutturale polimerica dell'acqua nei biosistemi (dipolo permanente, con legami covalenti e legami idrogeno, in particolari rapporti spaziali, quasi cristallini).

Markov (1981) ha studiato a fondo questo problema giungendo alla conclusione che diversi parametri biofisici dell'acqua esposta a un campo magnetico statico (assorbimento della luce, conducibilità elettrica, viscosità e suscettività magnetica) subiscono modificazioni che sono massime a certi valori di campo (450 gauss) e di tempo (30'). Ciò fa ritenere che potrebbe essere proprio l'acqua, che assorbe elettivamente nella regione delle Radiofrequenze (RF) e delle Microonde (MO), l'elemento intermediario fondamentale fra energie non ionizzanti e materia vivente (Bistolfi 1986).

Anche le caratteristiche fisiche di alcuni ioni, importanti nei meccanismi biologici, potrebbero rivestire un ruolo rilevante nell'interazione con campi magnetici. Per spiegare, ad esempio, il meccanismo di interazione di due campi magnetici paralleli, entrambi di debole intensità, uno statico e uno alternato, per i sistemi biologici è stato proposto l'effetto ciclotronico (Liboff 1986;

Chiabrera *et al.*, 1986; Blackman 1986). Quando la frequenza del campo magnetico alternato diventa uguale alla cosiddetta “*frequenza di ciclotrone*”¹ di una specie ionica, data dalla formula:

$$\text{frequenza di ciclotrone} = (1/6,28) (q/m) B$$

dove “q/m” è il rapporto tra la carica elettrica e la massa dello ione e B il campo magnetico statico applicato, si può determinare una variazione transitoria nel flusso delle varie specie ioniche che attraversano le membrane cellulari. Applicando ad esempio, in un organismo soggetto soltanto al campo magnetico terrestre un campo debole alternato avente la frequenza di ciclotrone del calcio (37,5 Hz), si osserva la formazione di picchi periodici nell’affluenza di ioni calcio nel cervello, cosa che certamente ne può modificare la fisiologia (Del Giudice 2004).

Se fin qui si è parlato indistintamente di campo magnetico o elettromagnetico, bisogna considerare che per quanto riguarda il comportamento fisico, il campo elettrico ed il campo magnetico, a bassa frequenza, possono essere considerati entità tra loro indipendenti. Tale indipendenza risulta importante in relazione al diverso comportamento che queste due forze hanno rispetto alla materia, e cioè:

- a) il campo elettrico può essere facilmente schermato ed inoltre può scaricarsi attraverso le parti del corpo che sono a contatto con il terreno
- b) il campo magnetico è difficilmente schermabile, passa attraverso tutti i materiali, induce nel corpo correnti elettriche secondarie che permangono al suo interno muovendosi circolarmente

Fonti di esposizione

L’indipendenza del campo elettrico dal campo magnetico alle frequenze estremamente basse, se da un lato consente di prendere in considerazione separatamente gli effetti delle due forze (Soffritti 1999) dall’altro tende a dare maggiore importanza alla componente non schermabile dell’onda, quella magnetica, giustificando il fatto che la maggioranza delle ricerche effettuate sull’argomento si limita a considerare gli effetti dell’esposizione al campo magnetico. D’altro canto è pur vero che sono proprio i campi elettromagnetici ELF (Extremely Low Frequency) a rivestire sempre maggiore importanza in quanto hanno come sorgenti oggetti a noi molto vicini e comuni (Tab. 1).

¹ La frequenza di ciclotrone indica il numero di giri che lo ione avente carica **q** e massa **m** descrive in un piano perpendicolare al campo magnetico **B**

FONTI AMBIENTALI

SORGENTE	FREQUENZA	LIVELLI DI ESPOSIZIONE	CARATTERISTICHE
Fondo ELF in aree urbane	50/60 Hz	1-100 V/m; 0.1 μ T	permanente
Linee elettriche di trasmissione	50/60 Hz	1-10 kV/m; 1-30 μ T	Al di sotto della linea
Sistemi di antitaccheggio	0.1- 1 kHz	1-100 μ T	Al centro del passaggio
Sistemi metal-detector	0.1-5 kHz	1-5 μ T	Al centro del passaggio
Fondo urbano per le radiofrequenze	Fino a 1 GHz	0.1-2 V/m	Permanente
Trasmettitori radio AM	0.4-1.6 MHz	100-400 V/m	A 50 m di distanza
Trasmettitori radio FM	88-108 MHz	0.1-2 V/m	A 1.5 Km di distanza
Trasmettitori televisivi UHF	470-870 MHz	0.1-2 V/m	A 1.5 Km di distanza
Stazioni radio base GSM	890-960 MHz	0.1-1 V/m	A 50 m di distanza
Stazioni radio base DCS	1800 MHz	0.1-0.5 V/m	A 50 m di distanza
Radar per il controllo del traffico aereo	1-10 MHz	10-60 V/m	A 100 m di distanza

FONTI DOMESTICHE

SORGENTE	FREQUENZA	LIVELLI DI ESPOSIZIONE	CARATTERISTICHE
Fondo ELF indoor (impianti elettrici)	50/60 Hz	1-30 V/m; 0.1 μ T	Permanente
Elettrodomestici	50/60 Hz	10-250 V/m; 0.01-5 mT	A 30 cm di distanza
		50-150 V/m; 0.1-1 μ T	A 30 cm di distanza
Termocoperte	50/60 Hz	250-1000 V/m; 1-5 μ T	-
Televisori	50-100 Hz;	1-10 V/m; 0.01-0.2 μ T	A 50 cm di distanza
	15-70 kHz		
Walkie-Talkie	27 MHz	1000 V/m	A 5 cm di distanza
Telefoni cellulari	900 MHz	40-100 V/m	A 1-2 cm di distanza
	1.8 GHz	10-30 V/m	A 10 cm di distanza
Forni a microonde	2.45 GHz	< 20 V/m	A 30 cm di distanza

FONTI OCCUPAZIONALI

SORGENTE	FREQUENZA	LIVELLI DI ESPOSIZIONE	CARATTERISTICHE
Altiforni e fonderie	50/60 Hz	100 μ T-10 mT	Per tutto il ciclo lavorativo
Apparecchi per riscaldamento a induzione	2-25 kHz	10 μ T- 1 mT	A 0.1-1 m di distanza
	0.1-10 MHz	0.2-100 A/m	Per tutto il ciclo lavorativo
Saldatrici elettriche	10 kHz	100 μ T- 2 mT	A 50 cm di distanza
Videoterminali	50/60 Hz	1-20 V/m; 0.01-0.1 μ T	Posizione operatore
	15-70 kHz		
Apparecchi per saldatura della plastica	27.12 MHz	100-1000 V/m	Per tutto il ciclo lavorativo
Apparecchi per tempera a induzione	27.12 MHz	0.5 A/m	Per tutto il ciclo lavorativo
Trattamento del legno	27.12 MHz	100-150 V/m	A 50 cm di distanza
Diatermia marconiterapia	27.12 MHz	10-500 V/m	A 50 cm di distanza
Diatermia radarterapia	2.45 GHz	5-200 V/m	A 30 cm di distanza

Tab. 1: Alcuni esempi di sorgenti di campi magnetici con cui si entra facilmente in contatto nella vita di tutti i giorni. Vengono riportate: le frequenze (in Hz) che caratterizzano le radiazioni emesse dalle diverse sorgenti considerate, il livello di esposizione a cui un individuo si può trovare esposto e la distanza alla quale è stata misurata l'intensità del livello di esposizione. Nel caso di alcune esposizioni di tipo lavorativo e quando si parli di fondo naturale di esposizione, casi in cui la distanza dalla sorgente è irrilevante e l'intensità di esposizione risulta costante in tutto l'ambiente, viene indicata, in maniera generale, la durata dell'esposizione. Per una più facile lettura le fonti di radiazione sono state suddivise in fonti ambientali, domestiche e occupazionali.

Tab. 1: Several examples of sources of magnetic field with which people can come into contact during their daily life. The table also shows: the frequencies that characterize the radiations emitted by the considered different sources, the exposure level that a person can undergoes and the distance the intensity of exposure level has been measured. When working exposures or natural background exposure are considered, the length of exposure is reported, in a general way, instead of the distances from the sources. In fact in those particular situations the distance from the source is insignificant and the exposure intensity remains constant all around the environment. For a easier reading the sources of radiation have been divided into environment, domestic and working origin.

E' noto che l'intensità del campo magnetico decresce con l'aumentare della distanza dalla sorgente, tuttavia l'estinzione del campo magnetico si verifica con caratteristiche diverse secondo la tipologia di tali sorgenti. Infatti, mentre l'intensità del campo magnetico prodotto dagli elettrodomestici si abbassa notevolmente, quasi ad estinguersi, ad una distanza di 30-50 cm da essi, l'intensità del campo magnetico generato dalle linee elettriche decresce e si estingue a distanze molto maggiori.

Per quanto riguarda le sorgenti di campo magnetico relative alle varie attività professionali/occupazionali, con l'eccezione dei videoterminali la cui intensità di campi elettromagnetici a bassissima frequenza è quasi azzerata alla distanza di 30-40 cm dallo schermo, la valutazione del decremento rispetto alla distanza risulta ininfluenza in quanto le varie attività lavorative vengono in genere svolte a stretto contatto con tali sorgenti.

Oltre alle caratteristiche del decremento dell'intensità del campo magnetico con la distanza, un altro parametro importante di cui si deve tenere conto è la durata dell'esposizione. Mentre l'esposizione al campo magnetico prodotto dagli elettrodomestici può essere considerata puntiforme (pochi minuti al giorno) e l'esposizione professionale al massimo può arrivare alle 40 ore di lavoro settimanale, per quanto riguarda l'esposizione di persone residenti (in particolare bambini ed anziani) in abitazioni localizzate in prossimità di linee elettriche, essa può risultare molto più prolungata (dell'ordine anche di 15-20 ore al giorno).

Le evidenze epidemiologiche

In conclusione, da quanto sopra detto in merito all'intensità del campo magnetico prodotto dalle varie sorgenti, al suo grado di estinzione con la distanza in dipendenza della tipologia delle sorgenti medesime ed alla durata della esposizione in relazione alle varie situazioni, emerge che il settore a rischio potenziale più elevato e con necessità prioritarie di intervento al fine di ridurre l'esposizione della popolazione ai campi magnetici, risulta essere quello che riguarda le linee elettriche di trasporto e distribuzione dell'energia elettrica che passano in prossimità di insediamenti come abitazioni, scuole, edifici sociali, uffici, ecc. (Soffritti 1999).

Infatti oggi l'attenzione è diretta soprattutto alle linee elettriche ad alta tensione che, per legge, hanno una frequenza costante di 50 Hz in Europa e 60 Hz negli Stati Uniti.

I primi dati sui possibili effetti negativi per la salute dei campi ELF risalgono alla fine degli anni '60, allorché ricercatori sovietici riportarono i risultati di un'indagine condotta su un gruppo di lavoratori di una sottostazione di trasformazione elettrica. Secondo tale studio, i disturbi di carattere nervoso/comportamentale denunciati dai lavoratori erano da correlare alla loro esposizione a campi elettromagnetici (Silverman 1973). Questa asserzione al momento non suscitò però grande interesse nella comunità scientifica. Per alcuni anni ancora le ricerche effettuate furono espletate in condizioni sperimentali diverse, con differenti condizioni di campo naturale e artificiale, differente materiale biologico, differenti campi di applicazione, differenti parametri di valutazione, rendendo estremamente difficile un confronto diretto dei risultati e addirittura impossibile estrapolare all'uomo i dati, ottenuti sugli animali, spesso controversi e contraddittori (Oliva 1986).

E' soltanto nel 1979 che, a seguito di un'indagine condotta a Denver, in Colorado, fu ipotizzata per la prima volta un'associazione causale tra esposizione a campo elettromagnetico a

bassissima frequenza ed aumento del rischio di leucemia e di tumori del sistema nervoso (Wertheimer & Leeper 1979). Successivamente furono condotte molte altre indagini epidemiologiche aventi per oggetto gli effetti dell'esposizione di categorie della popolazione, con prevalenza di quella infantile, alle emissioni elettromagnetiche di elettrodomestici e sorgenti domestiche e bisogna dire che le indagini condotte negli anni novanta, soprattutto in Scandinavia (Feychting & Ahlbom 1993; Olsen *et al.*, 1993; Verkasalo *et al.*, 1993), si caratterizzano per un migliore disegno di studio e per una migliore valutazione dell'esposizione, anche attraverso misurazioni dirette del campo magnetico nelle abitazioni.

Oggi sono disponibili molti dati anche per quanto riguarda l'insorgenza di leucemie e tumori del sistema nervoso centrale in lavoratori occupati in attività che implicano esposizione a campi elettrici e magnetici ELF (elettricisti, operatori telefonici, ecc.) e diverse sono le risultanze e le teorie esposte. Studi di epidemiologia hanno correlato l'incidenza di cancro, compreso quello ai polmoni e al cervello ma, soprattutto, di leucemia infantile, all'esposizione a campi ELF (Savitz *et al.*, 1988; London *et al.*, 1991; Feychting & Ahlbom 1993; Guénel *et al.*, 1993; Olsen *et al.*, 1993; Kheifets *et al.*, 1995; Ahlbom 1997; Portier & Wolfe 1998; Repacholi & Greenebaum 1999; Greenland *et al.*, 2000). L'esposizione lavorativa ai campi magnetici è stata poi correlata con una maggior incidenza di gravi malattie neurologiche, quali il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la sclerosi laterale amiotrofica (Rossi *et al.*, 1999). Alcune ricerche hanno anche suggerito l'esistenza di una possibile associazione tra l'esposizione ai campi magnetici ELF ed effetti non neoplastici, soprattutto per quella parte di popolazione affetta da ipersensibilità ai campi elettrici e magnetici, tra cui sindromi depressive, disturbi cardiaci, cefalee e tendenze al suicidio. La questione rimane comunque tuttora aperta e, recentemente, in alcuni studi è stata avanzata l'ipotesi che l'aumento delle leucemie osservato sia dovuto alla selezione di campioni influenzata, inconsapevolmente, dalle attese dello stesso ricercatore (Ahlbom *et al.*, 2000; Ahlbom *et al.*, 2001).

Gli studi di laboratorio

Per comprendere meglio le potenziali capacità cancerogene delle radiazioni non ionizzanti si è cercato di definire, in condizioni controllate di laboratorio, *in vitro* ed *in vivo*, le loro proprietà genotossiche (McCann *et al.*, 1998). Numerosissimi sono gli studi condotti a questo riguardo (McCann *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1993; Juutilainen & Lang 1997; McCann *et al.*, 1998) caratterizzati però da una grande variabilità delle condizioni di esposizione che spesso rende difficili, se non impossibili, i confronti dei risultati.

Sono stati analizzati campi ELF a differenti frequenze e intensità, comprendendo le microonde (D'Andrea *et al.*, 2003) e le radiofrequenze (Tice *et al.*, 2002; Chou & D'Andrea 2003; Kundi *et al.*, 2004), ma anche campi magnetici ed elettrici statici; sono stati fatti variare anche i tempi di

esposizione, da quelle che possono essere considerate puntiformi (poche ore) a esposizioni croniche (diversi giorni). Sono stati condotti studi *in vitro* a livello cellulare, molecolare, genetico e in sistemi acellulari, e *in vivo* su vertebrati, invertebrati, vegetali e batteri (Tab. 2).

EFFETTO REGISTRATO IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE	SISTEMA BIOLOGICO ADOTTATO	CARATTERISTICHE FISICHE DEI CAMPI UTILIZZATI	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
Alterazioni delle concentrazioni di Ca ²⁺ e Na ⁺ nel citosol	Splenociti di topo Eritrociti umani Vescicole contenenti Na,K-ATPasi	60 Hz, 30' – 24 h 1 Hz – 1,2 MHz, 30 - 60 s 1 – 3000 Hz, 0 – 1 mT	(Blank & Soo 1997; Chenn <i>et al.</i> , 1998; Harakawa <i>et al.</i> , 2004)
Effetti discordi sul tasso di fosforilazione, calcio-calmodulina dipendente, della catena leggera della miosina in un sistema acellulare	miosina	Campo magnetico statico 0 – 200 µT	(Lednev 1991; Male 1992; Markov <i>et al.</i> , 1992, 1993; Markov & Pilla 1994a, 1994b; Pilla <i>et al.</i> , 1997; Coulton <i>et al.</i> , 2000)
Alterazione dell'attività enzimatica dell'ornitina decarbossilasi (ODC). Il campo magnetico ha effetto stimolante se rimane coerente per almeno 5-10s. L'effetto può essere inibito se il campo diventa incoerente (ad esempio se si sovrappone un rumore elettromagnetico)	Cellule murine L929; milza e testicoli di topi CBA embrioni di pollo	50 Hz, 8 µT, 32 giorni outdoors.	(Litovitz <i>et al.</i> , 1991, 1994, 1995; Svedenstal <i>et al.</i> , 1999b).
Aumento dei livelli metabolici di monoammine nel cervello quando l'esposizione è nella stessa direzione della posizione dell'animale Incremento dei livelli di serotonina (5-HT) nella corteccia cerebrale ma non nella ghiandola pineale.	Topi C57BL, ICR, SAMP8 Ratti Wistar da madri esposte durante la gestazione Maschi di Ratti Sprague-Dawley (2-3 mesi)	60 Hz, 10 gauss con differenti orientamenti Forza del campo magnetico: 36,36 gauss. 5min due volte alla settimana 60 Hz; 0,5, 1, 1,5, 2 mT per 60 min.	(Lai & Carino 1999; Kabuto <i>et al.</i> , 2000; Cañedo <i>et al.</i> , 2003)
Diminuzione della concentrazione di melatonina nel sangue	Mucche Holstein	Campo elettrico verticale 10 kV/m Campo magnetico orizzontale 30 µT 16 h/giorno per 4 settimane	(Rodriguez <i>et al.</i> , 2004)
Alterazioni morfologiche di immunociti	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	50 Hz, 200 – 1000 µT	(Ottaviani <i>et al.</i> , 2002)
Modificazioni della morfologia cellulare associate ad una redistribuzione dell'actina	cheratinociti umani cheratinociti boccali umani	2 mT, 50 Hz	(Manni <i>et al.</i> , 2002, 2004)
Aumento del numero di cellule che esprimono antigeni del virus di Epstein-Barr	Cellule linfoidi umane infettate con EBV	50 Hz	(Grimaldi <i>et al.</i> , 1997)

Effetti contrari sulla proliferazione cellulare: crescita inibita dall'aggiunta di un campo elettromagnetico di disturbo	cellule amniotiche umane (AMA) Linfociti umani (HPLs) Cellule murine di midollo osseo	50 Hz, 50 μ T 50 Hz, 5 mT 60 Hz, 1, 1,5, 2 mT 50 Hz 1 mT (CBPI) 50 Hz, 1,05 mT 50 Hz, 0,05 mT (CBPI) 50 Hz, 80 μ T	(Rosenthal & Obe 1989; Khalil & Qassem 1991; Kwee & Raskmark 1994; Raskmark & Kwee 1996; Scarfi <i>et al.</i> , 1999; Heredia-Rojas <i>et al.</i> , 2001; Van Den Heuvel <i>et al.</i> , 2001)
Effetto stimolante sulla proliferazione e sul differenziamento degli osteoblasti mediato da un aumento della sintesi di NO	Osteoblasti (MC3T3-E1) Osteoblasti da topi SD	Campo elettromagnetico pulsante (PEMF) 15 Hz; 0,6 mT 10 Hz, 200 mV cm ⁻¹ , 20 min.	(Tang <i>et al.</i> , 1998; Diniz <i>et al.</i> , 2002)
Effetti su cardiomiociti mediati dalla formazione intracellulare di ROS	Embrioni di 4 giorni	250 – 500 V/m, 90 s	(Sauer <i>et al.</i> , 1999)
Incremento di NO indotto da LPS	Fegato di topo BALB/C	60 Hz, 0,1 mT, 5,5 h	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 2000)
Alterazioni nei livelli di trascrizione di <i>c-myc</i> , <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i>	Cellule leucemiche umane Cellule PC12 Cellule T linfoblastoidi	Campo magnetico di disturbo a 60 Hz Campo sinusoidale 12,5 – 100 μ T 1 gauss, 15-20 min.	(Phillips <i>et al.</i> , 1992; Lin & Goodman 1995; Campbell-Beachler <i>et al.</i> , 1998)
Interferenza con l'espressione genica di BMP	Ratto, esposizione durante la vita intrauterina	Campo elettrico pulsante tipo GSM 9,4 GHz, 5 μ W/cm ²	(Pyrpasopoulou <i>et al.</i> , 2004)
Alterazioni nel DNA <i>in vitro</i>	Molecole di DNA di origine batterica, plasmidica e prodotti di amplificazione	Campo magnetico statico	(Potenza <i>et al.</i> , 2004)
Incremento di danno al DNA misurato con entrambe le versioni del <i>Comet assay</i> rilevato a seguito di esposizione, <i>in vitro</i> , intermittente ma non di una continua	Fibroblasti umani diploidi	50 Hz, onda sinusoidale 1000 μ T 24 h	(Ivancsits <i>et al.</i> , 2003)
Danno o sua assenza al DNA analizzato, <i>in vivo</i> , con il <i>Comet assay</i>	Cellule del cervello di ratti esposti <i>in vivo</i> e sacrificati immediatamente e dopo 4 h	Microonde 2450 MHz; SAR 0,6; 1,2 WKg ⁻¹ ; 2 h 60 Hz, 0,5 mT, 2 h 50 Hz, 8 μ T, 32 giorni outdoors 50 Hz, 0,5 mT, 14 giorni in laboratorio 60 Hz, 0,01 mT, 24 h, 48 h 1 mT, 60 Hz, 2 h	(Lai & Singh 1995; Malyapa <i>et al.</i> , 1998; Singh & Lai 1998; Svedenstal <i>et al.</i> , 1999a; McNamee <i>et al.</i> , 2002; Lagroye <i>et al.</i> , 2004)
Aumento di rotture al DNA misurato con il <i>Comet assay</i>		Raggi X + ELF > 50mT	(Miyakoshi <i>et al.</i> , 2000)

Interazione dei campi elettromagnetici sul tasso di apoptosi indotta da esposizione a raggi X. Dipendenza dal tipo di cellula utilizzata	Cellule xrs5 CHO-K1 MCF-7 Cellule di astrocitoma umano	60 Hz, 5 mT, 5, 10 h 60 Hz, 90 – 120 μ T, >6 h	(Wei <i>et al.</i> , 2000; Ding <i>et al.</i> , 2001; Tian <i>et al.</i> , 2002)
Induzione o mancata induzione di micronuclei	Midollo di topi BALB/c Topi adulti CBA/Ca	Campo magnetico statico 3, 4, 7 T, 24, 48, 72 h 50 Hz, 14 μ T 50 Hz, 0,05-1 mT, 72 h	(Scarfi <i>et al.</i> , 1999; Abramsson-Zetterberg & Grawè 2001; Suzuki <i>et al.</i> , 2001)
Nessun effetto genotossico rilevato da un approccio integrato con 4 differenti analisi: <i>Comet assay</i> , aberrazioni cromosomiche, micronuclei, scambio fra cromatidi fratelli (SCE). Nessun effetto sinergico con radiazioni ionizzanti.	Sangue umano e piccoli esposti in utero	Campo magnetico uniforme generato da una bobina di Helmholtz 50 Hz, 1 mT, 2 h	(Stronati <i>et al.</i> , 2004)
Discordanti effetti sulla variazione del tasso di riassorbimenti placentali e su quello delle malformazioni fetali (forse a causa del differente ceppo utilizzato). Indicazione di una riduzione del peso e della lunghezza dei feti. Cambiamenti nello sviluppo embrionale associato a parametri endocrinologici	Topi CBA/S Topi CBA/Ca Topi C3H Ratti Wistar Ratti Sprague-Dawley	Campo elettromagnetico pulsante 15 μ T Differenti tempi di esposizione durante la gestazione. 50 Hz, 13 - 130 μ T 20 kHz, 15 μ T 60 Hz fino a 10 G	(Tribukait <i>et al.</i> , 1987; Frölen <i>et al.</i> , 1993; Ryan <i>et al.</i> , 1996; Huuskonen <i>et al.</i> , 1998, 2001)
Effetti sulla capacità riproduttiva (ridotta capacità dei follicoli di maturare) e sulla morfologia degli spermatozoi. Assenza di aberrazioni cromosomiche negli spermatozoi	Follicoli preantrali da Swiss CD1, topi ceppo Of1, sperma umano	33, 50 Hz, 1,5 mT campo magnetico statico 0,7 T, 1 o 24 h/g, 35 g, 50 Hz, 20 mT, 2 h	(Tablado <i>et al.</i> , 1998; Cecconi <i>et al.</i> , 2000)
Alterazione del comportamento e del sonno	Topi Swiss CD1 Uomo	37 Hz	(Sher 2000; Del Seppia <i>et al.</i> , 2003)
Effetti su campi coltivati sotto linee di trasmissione elettriche	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Zea mais</i>	Linee trasmissione elettrica, 0,4 - 4,5 μ T	(Soja <i>et al.</i> , 2003)

Tab. 2: In tabella vengono riportati, in modo sintetico, i risultati di alcuni studi sull'esposizione a campi magnetici. Si può notare la variabilità delle caratteristiche di esposizione e dei sistemi biologici utilizzati.

Tab. 2: Results from several studies about the magnetic fields exposure are reported briefly in the table. Variability of physical parameters of the exposure and of the biological system used can be noted.

Effetti a livello morfologico

I possibili effetti che l'esposizione a campi magnetici durante la gravidanza potesse avere sui nascituri sono stati oggetto d'interesse in diversi studi *in vivo* sia su ratti che topi di differenti

ceppi. Normalmente sono stati analizzati parametri quali il peso dei feti e la loro lunghezza ma anche il tasso di impianti e riassorbimenti fetali oltre la presenza di malformazioni esterne e scheletriche. I risultati, nella maggior parte dei casi, sono stati negativi e i pochi effetti registrati in seguito ad esposizione, come ad esempio l'incremento di riassorbimenti placentali in topi CH3 (Frölen *et al.*, 1993) o delle malformazioni fetali in topi del ceppo CBA/S (Tribukait *et al.*, 1987), non sempre hanno trovato conferma in altri studi (Svedenstal & Johanson 1998). Una possibile causa potrebbe risiedere nella differente suscettibilità alle radiazioni dei diversi ceppi di topi utilizzati. A riprova di ciò si consideri che Walsh *et al.* (1989) non hanno trovato cambiamenti nel tasso di malformazioni fetali o in quello di riassorbimenti placentali in seguito all'esposizione di topi del ceppo CD1 a campi magnetici pulsanti.

Effetti a livello biochimico

Diversi studi sono stati indirizzati alla ricerca di possibili variazioni di parametri biochimici e dell'attività di diversi enzimi. In sistemi animali si è visto che l'esposizione di roditori a campi elettromagnetici aumenta l'attività dell'ornitina decarbossilasi nelle ghiandole mammarie (Mevisen *et al.*, 1995), riduce la concentrazione di melatonina nella ghiandola pineale e nel sangue (Reiter & Richardson 1992; Jentsch *et al.*, 1993; Yaga *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1994) e aumenta la concentrazione di serotonina e acido 5-idrossi-indolo-acetico nella ghiandola pineale e nel cervello (Lerchl *et al.*, 1990; Chance *et al.*, 1995; Cañedo *et al.*, 2003). Secondo Kabuto *et al.* (2000), comunque, in generale, il metabolismo delle monoamine è influenzato dai campi EMF solo quando, durante l'esposizione, il verso delle linee di campo è concorde a quello degli animali esposti. Anche l'attività colinergica sembra influenzata dall'esposizione di 60 minuti a campi magnetici di 2 mT (60 Hz). La sua diminuzione in seguito all'esposizione è comunque il risultato di un'interazione fra la durata e l'intensità della radiazione. Infatti sembra che lo stesso effetto si possa manifestare anche ad intensità più basse aumentando il tempo di esposizione (Lai & Carino 1999).

Come precedentemente accennato, anche l'attività dell'ornitina decarbossilasi (ODC), un enzima coinvolto nel primo passaggio della sintesi delle poliammine coinvolte nella crescita cellulare (Heby & Persson 1990), è influenzata dai campi magnetici. Litovitz *et al.* (1991) hanno mostrato che in cellule esposte a 60 o 50 Hz l'attività dell'enzima raddoppia, ma che se la corrente è alternata lo stesso raddoppiamento dell'attività si ha solo se il tempo di coerenza della corrente è maggiore di 10 s. Il raddoppiamento dell'attività dell'ODC viene annullato inserendo una seconda corrente di disturbo (30 - 300 Hz): il livello del rumore introdotto necessario ad eliminare l'effetto del primo segnale riflette l'ampiezza del segnale che causa il cambiamento (Mullins *et al.*, 1993). Svedenstal *et al.* (1999) invece, non trovano variazioni dell'attività di questo enzima in topi CBA esposti *in vivo* a campi di 50 Hz e 8 μ T per 32 giorni.

Per quello che riguarda la melatonina Rodriguez *et al.* (2004) hanno riscontrato un lieve decremento della sua concentrazione nel sangue circolante anche in mucche Holstein che stavano allattando esposte ad un campo elettrico verticale di 10 kV/m e uno magnetico orizzontale di 30 μ T per 16 h/giorno per quattro settimane. Gli stessi autori hanno anche osservato che la concentrazione di prolattina nel plasma aumentava nelle mucche esposte che stavano allattando, ma diminuiva in quelle esposte ma che non stavano allattando.

Effetti a livello di membrana

I campi elettrici potrebbero, in primo luogo, agire sulla membrana cellulare a causa della sua alta resistenza e, conseguentemente, produrre cambiamenti sulla struttura e sulla funzione delle membrane e delle sue proteine come pure sulla permeabilità e sul potenziale di membrana influenzando tutte le corrispondenti reazioni fisiologiche o biochimiche (McLeod *et al.*, 1987; Goodman & Henderson 1988).

Gli studi forse più dettagliati sugli effetti dei campi elettromagnetici sono quelli sull'attività della pompa Na,K-ATPasi (Serpensu & Tsong 1984; Liu *et al.*, 1990; Blank 1992, 1995; Blank & Soo 1989, 1992, 1993, 1997; Chen *et al.*, 1998). Basse frequenze di campi elettrici sembrano inibire l'attività della pompa mentre campi magnetici a bassa frequenza sembrano avere un effetto di attivazione. Sebbene gli effetti siano opposti la frequenza alla quale i due campi interagiscono con questa struttura è molto simile. Più precisamente gli effetti osservati potrebbero essere dovuti all'interazione del campo elettrico o magnetico con cariche in movimento (che si muovono attraverso l'enzima) previste nei normali processi metabolici della cellula (Blank & Soo 1997).

Anche la possibile azione dei campi magnetici sullo ione calcio (Ca^{2+}) ha ricevuto attenzione. In diversi sistemi l'azione sia di campi magnetici che elettrici ha portato un aumento dell'afflusso di calcio attraverso le membrane (Lindstrom *et al.*, 1995; Mattsson *et al.*, 2001; Harakawa *et al.*, 2004; Lopucki *et al.*, 2004), ma, in altre occasioni, non è risultato alcun effetto dei campi sulla concentrazione di questo ione (Wey *et al.*, 2000) e di conseguenza sulle attività che da esso dipendono, come ad esempio la fosforilazione, calcio-calmodulina dipendente, della catena leggera della miosina (Coulton *et al.*, 2000).

Effetti sinergici su altri agenti genotossici

E' stata, inoltre, avanzata l'ipotesi che, i campi magnetici, pur non essendo agenti tossici di per sé, potrebbero essere in grado di magnificare gli effetti di sostanze dalle riconosciute capacità mutagene come i raggi X o gli ultravioletti. In effetti l'esposizione di cellule xrs5 a campi di 60 Hz e 5 mT e a raggi X (8 Gy) sembra provocare una diminuzione, anche se momentanea, del tasso di apoptosi, facendo diminuire i livelli della caspasi3 del p21 e del p53 e facendo aumentare l'espressione del gene bcl-2 (Tian *et al.*, 2002). Il danno al DNA di linfociti di ratti

irradiati *in vitro* con UVA e successivamente esposti a campi magnetici di 50 Hz e 40 μ T è risultato essere maggiore di quello presente nelle cellule irradiate solo con UVA (Zmyslony *et al.*, 2004). In cellule Jürkat esposte contemporaneamente a campi elettromagnetici a bassa frequenza e a due metaboliti del benzene, idrochinone (HQ) e 1,2,4-triidrossibenzene (BT), è stato osservato un livello maggiore di danno al DNA rispetto a quello registrato nelle cellule esposte solo ai due metaboliti (Moretti *et al.*, 2002). L'esposizione contemporanea delle cellule ai campi elettromagnetici e al benzene non ha però influenzato né il danno al DNA né la frequenza di comparsa di micronuclei (Pasquini *et al.*, 2004).

I campi magnetici potrebbero anche allungare la vita dei radicali liberi impedendo il loro ritorno ad uno stato energetico più stabile (Scaiano 1995; Okazaki *et al.*, 1998), anche se non sembra che l'esposizione a campi magnetici (60 Hz; 3 mT) magnifichi l'azione mutagenica di sostanze come il menadione il cui meccanismo di azione prevede la formazione di radicali liberi (O^{2-}) (Suri *et al.*, 1996). Comunque i campi elettromagnetici (60 Hz; 0,1 mT) pur non inducendo, da soli, la formazione di NO ne aumentano la formazione provocata dall'azione di lipopolisaccaridi (LPS) (Yoshikawa *et al.*, 2000). L'incremento della concentrazione di NO a seguito di esposizione a campi elettromagnetici pulsanti di 25 Hz e 0,6 mT potrebbe essere responsabile dell'incremento della proliferazione cellulare registrato da Diniz *et al.* (2002) in osteoblasti (MC3T3-E1) esposti per 15 giorni. Campi magnetici di 5 mT (60 Hz) potenziano anche l'effetto mutageno dell' H_2O_2 incrementando la formazione dell'8-idrossiguanosina (8-OHdG) (Koyama *et al.*, 2004). Ad intensità piuttosto alta (2,5 e 5 mT; 50 Hz) e in presenza di NO incrementano il tasso di mortalità cellulare (misurata dalla concentrazione della lattatodeidrogenasi LDH). Questo stesso effetto non viene registrato se invece di NO è presente lo ione ferroso (Fe^{2+}) (Boland *et al.*, 2002).

Effetti sulla trascrizione genica

Una particolare attenzione spetta agli studi degli effetti sul DNA e sulla sintesi di alcuni geni dell'esposizione a campi magnetici soprattutto in considerazione dei possibili effetti che un danno al DNA o l'alterazione della trascrizione di alcuni geni potrebbe avere sulla vitalità cellulare e quindi, in ultimo, sulla salute umana.

Sebbene in sistemi acellulari non sia stato notato alcun effetto sulla sintesi enzimatica del DNA e del RNA in seguito all'esposizione a campi di 0,25 o 0,5 T (60 Hz) o sulla riparazione degli appaiamenti errati delle basi del DNA (*mismatch repair*) dopo esposizione a 1 T (60 Hz) (Harada *et al.*, 2001), l'espressione di alcuni geni è risultata alterata. Campi magnetici di 1 gauss (60 Hz) inducono cambiamenti nella trascrizione di protooncogeni come *c-myc*, *c-fos* e *c-jun* (Phillips *et al.*, 1992; Campbell-Beachler *et al.*, 1998), ma anche, ad esempio, del gene *gcs*

che codifica per la ceramide glucosiltransferasi (GCS), implicata, come elemento causale, nella crescita e nel differenziamento di cellule umane (Wu *et al.*, 2000).

Effetti sul DNA

Quando il danno al DNA è analizzato con tecniche come il *Comet assay* per rilevare un danno a breve termine (che, cioè, viene registrato subito o poco tempo dopo l'esposizione o la somministrazione della sostanza da testare) i risultati sono spesso contrastanti. Alcuni studi riportano un incremento del danno al DNA in cellule di cervello di ratti esposti per due ore ad intensità di 0,25 mT (60 Hz) o per quarantotto ore ad intensità di 0,01 mT (60 Hz) (Lai & Singh 1997, 2004). Svedenstal *et al.* (1999a) hanno rilevato un danno al DNA sempre su cellule di cervello di topi CBA/Ca esposti in laboratorio a campi di 0,5 mT (50 Hz) per quattordici giorni, ma non in conseguenza di un'esposizione a cinque giorni alla stessa dose. Quando, invece, topi dello stesso ceppo, erano esposti in natura a campi generati da linee di trasmissione elettrica (50 Hz, 8 µT) veniva registrato un aumento del danno al DNA delle cellule del cervello solo dopo trentadue giorni di esposizione, il tempo più lungo fra quelli considerati (Svedenstal *et al.*, 1999b). Secondo McNamee *et al.* (2002) l'esposizione fino a quarantadue ore a campi magnetici di 1 mT (60 Hz) di topi di dieci giorni non causa aumento del danno al DNA nelle cellule cerebrali degli animali. Anche i risultati di esperimenti *in vitro* sono discordi: infatti campi di 50 Hz sembrano causare un danno al DNA di fibroblasti umani esposti a 35 µT (Ivancsits *et al.*, 2003) ma non in linfociti umani esposti a 1 mT (Stronati *et al.*, 2004) quando il danno biologico è misurato con il *Comet assay*.

La cellula potrebbe comunque riuscire, soprattutto se l'intensità del danno è debole o consiste principalmente di rotture al singolo filamento della doppia elica del DNA, a riparare il danno subito durante l'esposizione e rilevato con tecniche, come il *Comet assay*, al termine dello stimolo. Per valutare un danno che sia rimasto stabile nel DNA della cellula sono normalmente usati test come il test dei micronuclei o l'analisi delle aberrazioni cromosomiche o il test sister chromatid exchange (SCE). I risultati di questi test hanno generalmente dato esito negativo, sia *in vitro* su linfociti umani esposti a campi magnetici di 50 Hz e 1 mT (Stronati *et al.*, 2004), che *in vivo* su eritrociti di topi CBA/Ca adulti o esposti in utero a campi magnetici di 50 Hz e 14 µT (Abramsson-Zetterberg & Grawè 2001), senza fornire pertanto prove sulla mutagenicità effettiva dei campi magnetici.

La normativa

La grande varietà di studi, di esperimenti non sempre ripetuti, e quando ripetuti non sempre confermati, ha prodotto risultati difficilmente confrontabili e spesso contraddittori. Ma seppure si tenda a ritenere che i campi elettromagnetici non siano dannosi per la salute umana, viene presa in considerazione la possibilità che essi possano avere una qualche capacità genotossica.

Infatti l'International Agency for Research on Cancer (IARC 2001) classifica i campi magnetici ELF come possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B), soprattutto in base all'associazione, statisticamente rilevante, tra l'esposizione ai più alti livelli di campi elettromagnetici a livello residenziale e un incremento del rischio di leucemia infantile (Fulton *et al.*, 1980; Savitz *et al.*, 1988; Olsen *et al.*, 1993; Feychting & Ahlbom 1993; Verkasalo *et al.*, 1993; Tynes & Haldorsen 1997; Greenland *et al.*, 2000). I risultati di alcuni studi che suggeriscono un effetto dannoso dei campi elettromagnetici sulla salute umana non vanno quindi sottovalutati, soprattutto in campo legislativo.

L'ultimo decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri Italiano riguardante il problema dell'elettrosmog (D.P.C.M. 8/7/03) recepisce queste preoccupazioni e cerca di fissare i limiti di esposizione ed i 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.

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 μ T per l'induzione magnetica e 5 kV/m per il campo elettrico, intesi come valori efficaci.

A titolo di misura cautelativa, 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 di 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 μ T, da intendersi come mediana dei valori nell'arco delle 24 ore nelle normali condizioni di esercizio.

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 μ T per il valore dell'induzione magnetica, da intendersi come mediana dei valori nell'arco delle 24 ore nelle normali condizioni di esercizio.

Per quanto riguarda l'esposizione professionale il limite massimo consentito è di 2 T mediato nel tempo su una giornata di lavoro.

Va considerato comunque che le ultime ricerche scientifiche suggeriscono limiti ancora più bassi (0,2 μ T) di quelli indicati nella normativa per campi generati da elettrodotti (Area Elettrosmog 2004).

1.9 Comet Assay

Poiché il danno al DNA prodotto da agenti tossici è spesso tessuto- o cellula-specifico, la tecnica migliore per rilevarlo dovrebbe essere in grado di mettere in evidenza, in cellule singole, il danno al DNA e una sua eventuale riparazione in una grande varietà di condizioni sperimentali (Tice 1995b). Negli ultimi 20 anni sono state sviluppate diverse metodologie per misurare rotture ai filamenti del DNA prodottisi in cellule singole (Olive 1999). Rydberg & Johanson (1978) furono però i primi a quantificare in maniera diretta il danno al DNA in cellule isolate: una lisi in condizioni lievemente alcaline delle cellule, imprigionate in un letto di agarosio su un vetrino, permetteva uno srotolamento parziale del DNA. Dopo essere state neutralizzate, le cellule venivano colorate con arancio di acridina e l'ammontare del danno quantificato come rapporto di verde (che indicava rotture al doppio filamento) su rosso (che indicava rotture al singolo filamento). Più tardi questa tecnica fu adattata alla citometria a flusso incapsulando le cellule in un letto di agarosio prima dell'irraggiamento e della lisi alcalina (Rydberg 1984).

L'osservazione che il trattamento delle cellule con NaCl 2M e detergenti anionici portava alla formazione di "nucleoidi" composti da anelli (loops) di 50-100 Kb di DNA attaccati a una rete proteinasica (Cook & Brazell 1978) portò allo sviluppo del test dell'alone (Roti Roti & Wriarth 1987). In questo test le rotture al filamento del DNA delle singole cellule causano un rilassamento del DNA superavvolto e permettono l'espansione di un "alone" formato dagli anelli (*loops*) di DNA attaccato alla matrice nucleare di proteine. Nel 1984 Ostling e Johanson presentarono la nuova idea di utilizzare un'elettroforesi su gel applicata su cellule singole imprigionate in un letto di agarosio e precedentemente sottoposte a lisi, in condizioni neutre, per produrre nucleoidi. Durante l'elettroforesi il DNA rotto e carico negativamente era allontanato dal nucleotide verso l'anodo: cellule con danno più elevato mostravano un tasso di migrazione verso l'anodo maggiore. I vetrini venivano quindi colorati con bromuro di etidio e veniva misurata l'intensità della fluorescenza. Questa nuova tecnica mostrava una grande sensibilità nell'evidenziare danni al DNA e nella localizzazione di sub-popolazioni cellulari che mostravano un differente grado di danno (Ostling & Johanson 1987). Questa tecnica era in grado però di rilevare solo rotture al doppio filamento e si dimostrava utile solo in studi riguardanti le radiazioni o sostanze chimiche radiomimetiche (Tice 1995b). Nel 1988 Singh e collaboratori introdussero un'ulteriore modifica nel protocollo cambiando le condizioni dell'elettroforesi. Un'elettroforesi in condizioni alcaline ($\text{pH} > 13$) rendeva la tecnica in grado di rilevare rotture al singolo filamento e a siti alcalo-labili nel DNA di cellule singole. Poiché praticamente tutti gli agenti genotossici provocano rotture al singolo filamento e a siti alcalo labili in misura molto maggiore che non rotture al doppio filamento questa modifica aumentò di molto la sensibilità e l'utilità del test. Questa tecnica fu chiamata dagli autori "single cell gel" (SCG) ma è a tutt'oggi

conosciuta, probabilmente per ragioni storiche, con il nome di *Comet assay*. In seguito Olive e collaboratori modificarono ulteriormente la tecnica “neutra” di Ostling e Johanson (1984) inserendo una lisi alcalina seguita da un’elettroforesi in condizioni neutre (Olive *et al.*, 1990b) o lievemente alcaline (pH=12.3) (Olive *et al.*, 1990a) per rilevare rotture al singolo filamento. In ogni modo la versione di Singh *et al.*, (1988) sembra essere uno o due ordini di grandezza più sensibile delle altre (Tice 1995b).

Il *Comet assay*, come lo si conosce oggi, è quindi un test genotossico semplice e rapido in grado di misurare un livello di danno iniziale nel DNA di singole cellule (Anderson *et al.*, 1998; Olive 1999; Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003) e rivelare un ampio spettro di composti o agenti dannosi in grado di indurre nel DNA rotture al singolo o doppio filamento e ai siti alcalo-labili, e la formazione di crosslinks (Singh *et al.*, 1988; Fairbairn *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003).

Sebbene il vantaggio del *Comet assay* sulle altre tecniche che evidenziano un danno al DNA sia dato dalla sua capacità di misurare l’eterogeneità all’interno di popolazioni complesse di cellule, sono i vantaggi che questo metodo offre a livello pratico che l’hanno reso fra i più popolari nell’oncologia e nella tossicologia genetica (Deeley & Moore 1992; McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995; Tice & Strauss 1995; Collins *et al.*, 1997).

Grazie alla sua semplicità, sensibilità e al fatto che è sufficiente un piccolo numero di cellule per l’analisi e che quindi può essere condotto sul sangue ottenuto con la puntura di un dito o su campioni di tessuti solidi ottenuti da una biopsia fatta con ago aspirato (Tice 1995b), questo test non solo è stato suggerito come una tecnica ideale negli studi di biomonitoraggio ambientale (Collins *et al.*, 1997; Kassie *et al.*, 2000; Moller *et al.*, 2000) e di epidemiologia, ma è stato anche applicato in studi di genotossicità (Fairbairn *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1998; Marzin 1999; Sasaki *et al.*, 1999), ecotossicologia (Belpaeme *et al.*, 1998; Cotelle & Ferard 1999), e radiobiologia clinica (Olive *et al.*, 1990b, 1998). La sua versatilità ha reso possibile lo studio dei meccanismi di riparazione (Speit & Hartmann 1995; Alapetite *et al.*, 1997), il rilevamento dell’apoptosi (Fesus *et al.*, 2004), lo studio di agenti alchilanti (Monteith & Vanstone 1995), ossidanti (Gedik *et al.*, 1998) e che inducono crosslink (Pfuhler & Wolf 1996; Singh & Lai 1998; Merk & Speit 1999). Molti sono stati anche i composti la cui genotossicità è stata investigata con questo test inclusi metalli, pesticidi, oppiacei, nitrosammine e droghe anticancro (Rojas *et al.*, 1999).

In teoria qualunque cellula singola da qualsiasi tessuto può essere analizzata con il *Comet assay* (Collins *et al.*, 1997), incluse cellule di invertebrati (Salagovic *et al.*, 1996; Bolognesi *et al.*, 2004) e piante (Koppen & Verschaeve 1996). Il *Comet assay* neutro è stato anche utilizzato per

individuare cibi irradiati come carne, pesce e semi (Cerdea *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2004). Qualche centinaio di cellule per campione è un numero adeguato per un'analisi, così che quando il numero delle cellule a disposizione è limitato questo può diventare l'unico test utilizzabile per un'analisi di danno al DNA (Olive 1999).

Per quanto riguarda il tipo di danno che il *Comet assay* è in grado di rilevare bisogna considerare le due principali versioni del test: quella in condizioni neutre e quella in condizioni alcaline.

Il *Comet assay* eseguito in condizioni neutre (Olive *et al.*, 1991; Hu & Hill 1996; Marples *et al.*, 1998; Sarkaria *et al.*, 1998) rileva rotture al doppio filamento di DNA in quanto quest'ultimo viene mantenuto in forma di doppio filamento durante l'elettroforesi. Questo tipo di lesione sembra essere il primo responsabile della mortalità cellulare associata all'esposizione a radiazioni ionizzanti (sensibilità del test dell'ordine di 2 - 3 Gy) (Olive *et al.*, 1991).

Nella versione alcalina del test, il DNA che migra è in forma di singolo filamento; quindi si possono evidenziare sia rotture al doppio filamento, che normalmente sono meno del 5% del danno totale, come al singolo e anche ogni tipo di lesione che può essere trasformata, nelle condizioni di pH alcalino usate, in una rottura al singolo filamento, ad esempio i danni ai siti alcalo-labili. In quest'ultimo caso una maggiore sensibilità può essere ottenuta aumentando la durata del tempo dello srotolamento della doppia elica (unwinding) prima dell'elettroforesi (Tice 1995b).

Il limite di rilevabilità del test nella versione alcalina (pH>13), stimato da Gedik *et al.* (1992) è di 0,1 rotture di DNA per 10^9 dalton (Da).

La capacità di evidenziare sia rotture al singolo che al doppio filamento è ridotta in popolazioni cellulari che contengono cellule in fase S (problema che non è limitato solo a questo test). Cellule che sono in fase di sintesi del DNA contengono forchine di replicazione e "bolle". Ogni forcina si comporta, quando è esposta ad ambiente alcalino, come una rottura a singolo filamento causando un incremento del danno basale in cellule in fase S. In cellule non irradiate che si trovino in fase S possono essere calcolate fino duemila "rotture" false e questo riduce la sensibilità del test nel rilevare un danno causato da basse dosi di radiazioni (Olive 1999). Metodi che utilizzano il radio labelling per rilevare un danno al DNA possono minimizzare questo problema perché in questo modo le forchine di replicazione e i frammenti di Okasaki non vengono inclusi nella misura della risposta. In condizioni neutre, in cellule in fase S, le strutture di replicazione inibiscono la migrazione durante l'elettroforesi e la pendenza della curva dose risposta risulta ridotta del doppio o del triplo (Olive *et al.*, 1991; Olive & Banáth 1993).

Oltre a danni diretti al DNA, possono essere rilevati anche processi che introducono un gap nel singolo filamento, come eventi incompleti di riparazione per escissione (*excision repair*) (Tice *et al.*, 1990; Green *et al.*, 1992) incubando le cellule, esposte per esempio a UV, a 37° C con

afidilcolina (Gedik *et al.*, 1992) o citosina arabinosio (Andrews *et al.*, 1990); la prima inibisce la sintesi del DNA ritardando il sistema di riparo, la seconda funziona come un terminatore di catena e impedisce la chiusura dei siti rotti sui filamenti di DNA. Danni indotti alle basi da radiazioni possono essere messi in evidenza usando enzimi come la endonucleasi III o la glicosilasi del DNA che creano rotture al singolo filamento all'altezza delle specifiche basi danneggiate dall'attacco di radicali (Wallace 1988; Collins *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1997).

Con il *Comet assay* possono essere testate anche sostanze che inducono crosslinks (Olive *et al.*, 1992; Olive 1995; Pfuhrer & Wolf 1996; Olive & Banáth 1997; Wardd *et al.*, 1997). Essi sono le uniche modificazioni del DNA conosciute che causano, nel *Comet assay*, una effettiva diminuzione nella migrazione del DNA durante l'elettroforesi. Infatti essi impediscono ai filamenti di DNA di separarsi negli alcali, quindi la quantità di DNA in grado di migrare durante l'elettroforesi diminuisce a mano a mano che il numero di crosslinks aumenta. I crosslinks (DNA-proteina, DNA-DNA interstrand e DNA-DNA intrastrand) possono essere indotti da vari agenti, sia fisici che chimici, molti dei quali ben conosciuti o per lo meno sospetti cancerogeni come ad esempio la formaldeide e alcuni composti metallici come l'arsenico, il nickel e il cromo (Merk *et al.*, 2000). Diverse sostanze che causano la formazione di crosslinks vengono inoltre usate come medicamento durante la chemioterapia per il trattamento del cancro (Snow 1992; Zamble & Lippard 1995). Durante gli ultimi anni sono state proposte svariate modificazioni del protocollo standard del *Comet assay* in modo da permettere a questo test di individuare, in maniera più semplice e allo stesso tempo più efficace, gli agenti che inducono i crosslinks (Olive *et al.*, 1992; Olive & Banáth 1995; Pfuhrer & Wolf 1996; Miyamae *et al.*, 1997; Tice *et al.*, 1997). Ad esempio, per identificare la presenza di crosslinks prodotti da sostanze come l'azoto di mostarda (nitrogen mustard) o il cis-platino, le cellule vengono esposte a radiazioni ionizzanti in aggiunta alle sostanze da testare (le radiazioni ionizzanti non sembrano produrre molti crosslinks) e la differenza nell'estensione della migrazione del DNA nei due trattamenti può essere usata come una misura della presenza di crosslinks (Olive & Banáth 1995; Speit & Merk 2002), oppure questi possono essere messi in evidenza aumentando la durata dell'elettroforesi al punto tale che il DNA delle cellule controllo mostri una migrazione significativa (Tice 1995b). Crosslinks DNA-proteina sono stati anche analizzati incubando i vetrini, prima dell'elettroforesi, con proteinasi K che rimuove le proteine dal DNA. Si è quindi paragonata la migrazione del DNA in vetrini trattati e non trattati con proteinasi K. Il DNA carico negativamente migra verso l'anodo durante l'elettroforesi; la maggior parte dei crosslinks DNA-proteina è carico positivamente e si muove verso il catodo ostacolando, quindi, la migrazione del DNA (Singh & Lai 1998; Merk *et al.*, 2000). Speit & Merk (1999) hanno testato la capacità di diverse sostanze

di indurre crosslinks utilizzando la versione alcalina del *Comet assay* e hanno trovato che questa versione del test rileva i crosslinks DNA-proteina (DPC) indotti dalla formaldeide (Merk & Speit 1998) e non i crosslinks DNA-DNA (Merk & Speit 1999). Dato che gli agenti che inducono crosslinks legano il DNA con il DNA o con le proteine essi possono inibire la migrazione spontanea del DNA indotta da sostanze mutagene (Merk *et al.*, 2000) va sottolineato che gli agenti che inducono crosslinks possono non indurre solo crosslinks ma anche altre alterazioni o malformazioni del DNA che potrebbero portare, direttamente o indirettamente ad un aumento della migrazione del DNA nell'elettroforesi (Merk *et al.*, 2000). La valutazione della presenza di crosslinks, quando questi si formano contemporaneamente ad altri tipi di lesioni al DNA, può risultare difficile in quanto il risultato finale sarà una compromesso fra l'effetto inibitore della migrazione del DNA dato dai crosslinks e l'effetto promotore della migrazione dovuta agli altri tipi di lesioni (Hartmann & Speit 1995; Tice *et al.*, 1992).

Va comunque notato che un elevato numero di rotture ai filamenti si traduce, alla fine, in una perdita di DNA. Infatti frammenti più piccoli di 50 Kb possono andare persi durante la lisi e l'elettroforesi o potrebbero non essere adeguatamente colorati. Quindi, in presenza di un elevato background di rotture, mettere in evidenza un piccolo numero di crosslinks potrebbe essere difficoltoso (Olive 1999).

La morte cellulare provoca un incremento del livello delle rotture ai filamenti di DNA. Con il *Comet assay* le immagini delle comete apoptotiche dovrebbero apparire come comete con coda larga e diffusa e testa piccola mentre quelle di cellule necrotiche come comete con testa larga e coda sottile di diversa lunghezza (difficilmente distinguibili, soprattutto nei primi stadi del processo, da code risultanti da danno di tipo genotossico). Comunque queste comete possono ugualmente essere presenti dopo trattamenti con alte dosi di radiazioni o alte concentrazioni di forti mutageni in condizioni nelle quali l'apoptosi non è possibile, indicando che queste comete non possono essere considerate inequivocabilmente come apoptotiche o necrotiche (Tice *et al.*, 2000; Choucroun *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2003; Rundell *et al.*, 2003).

Entrambe le versioni del *Comet assay* sono state usate diffusamente per studiare la riparazione delle rotture al doppio e al singolo filamento (Tice 1995b). Rotture prodotte da radiazioni ionizzanti sono normalmente riparate in cellule normali, linfociti, fibroblasti macrofagi di topo e in diverse cellule trasformate. Normalmente il 50% del danno è riparato entro i primi quindici minuti e la riparazione completa si ha entro una o due ore (Tice 1995b). Il test è anche in grado di determinare se un lento riallaccio delle rotture dei filamenti è dovuto alla presenza di una sub-popolazione di cellule fortemente danneggiate o se tutte le cellule riparano lentamente (Olive 1999). Uno studio di Singh *et al.* (1990) ha dimostrato un declino, collegato all'età, nelle capacità di riparazione del DNA in una piccola sub-popolazione di linfociti. Questo porta anche

a valutare la necessità di analizzare non solo i parametri classici utilizzati per quantificare il danno al DNA ma anche la distribuzione delle misurazioni effettuate sulle singole cellule (Jostes *et al.*, 1993; Tice 1995b; Tice & Strauss 1995).

Il danno o la riparazione di specifiche regioni cromosomiche può anche essere analizzato applicando la tecnica FISH (fluorescence in situ hybridization) alle comete (Santos *et al.*, 1997; McKelvey-Martin *et al.*, 1998).

Anche il danno da radiazioni ultraviolette è stato esaminato largamente con il *Comet assay* alcalino (Green *et al.*, 1992; Gedik *et al.*, 1992; Arlett *et al.*, 1993; Noz *et al.*, 1996; Lehmann *et al.*, 1998).

In aggiunta al vasto impiego negli studi di laboratorio il *Comet assay* sta diventando sempre più in uso negli studi di biomonitoraggio ambientale (Faust *et al.*, 2004). Situazioni di esposizione critiche, conseguenti all'eliminazione di rifiuti tossici, vengono normalmente analizzate indirettamente attraverso l'uso di tecniche analitiche che caratterizzano i livelli di inquinanti conosciuti. Ma queste tecniche non dicono nulla riguardo il rischio biologico associato con miscele di diversi inquinanti, su come esse interagiscono o si comportano nelle diverse catene ambientali (Tice 1995a). La possibilità di valutare le possibili conseguenze, a livello ambientale, del rischio biologico derivante dai rifiuti tossici è data dall'utilizzo di test che valutino il danno genotossico (e altri effetti) in organismi sentinella (Tice 1995a). Uno dei primi studi di biomonitoraggio ambientale, nel quale è stato utilizzato il *Comet assay*, è stato quello di Nascimbeni *et al.* (1991) su sangue, midollo, cervello e fegato di *Ochrotomys muttalli* proveniente da un sito contaminato con tricloroetilene, cloroformio, pesticidi e solventi di laboratorio. Anche in questo caso oltre alle medie sono state analizzate le distribuzioni e un'analisi del coefficiente di dispersione è stato utile per chiarire che nei tessuti degli animali provenienti dal sito contaminato erano presenti popolazioni, seppur piccole, di cellule altamente danneggiate. Successivamente altri studi sono stati portati avanti su lombrichi (*Eisenia foetida*) (Verschaeve *et al.*, 1993), ciprinodontidi (*Oryzias latipes*) (Tice 1995a), e molluschi (*Dreissena polymorpha*, *Unio tumidus*) (Labieniec & Gabryelak 2004) ma anche su vertebrati come *Mus spretus* (Festa *et al.*, 2003).

L'osservazione che l'esposizione a radiofrequenze (2450MHz) (Lai & Singh 1995) e a campi magnetici ELF (60Hz) (Lai & Singh 1997; Singh & Lai 1998) produceva rotture al singolo filamento del DNA rilevabili nel *Comet assay* alcalino applicando il test sul cervello di ratti di laboratorio, ha suscitato notevole interesse riguardo al problema dell'esposizione della popolazione ad inquinamento elettromagnetico. Questi risultati, tuttavia, non sempre hanno ricevuto conferma da altri studi (Malyapa *et al.*, 1998; Svedenstal *et al.*, 1999a, 1999b; McNamee *et al.*, 2002; Lagroye *et al.*, 2004).

Negli studi di ecogenotossicità questo test, soprattutto la versione alcalina, ha trovato largo uso nel valutare la genotossicità di sostanze chimiche sia *in vitro*, dove sono stati usati soprattutto linfociti umani, cellule di linfoma di topo, cellule CHO e colture primarie di epatociti di roditori, che *in vivo* (Tice 1995b; Anderson *et al.*, 1998; Dusinska *et al.*, 2004; Kammann *et al.*, 2004; Robbiano *et al.*, 2004).

Nei casi in cui viene fatto uso di sangue intero bisogna tener presente che i leucociti sono un complesso eterogeneo di cellule che hanno una durata di vita variabile da settimane a decenni (granulociti), mentre altre vivono solo alcune ore. L'analisi dovrebbe essere focalizzata solo sulle cellule veramente presenti al periodo dell'esposizione (Tice 1995b). Per ovviare al problema dell'isolamento delle varie classi di cellule presenti nel sangue Strauss *et al.* (1994) introdussero una tecnica immunologica che permettesse di riconoscere le singole cellule presenti nell'agarosio grazie alla copresenza di letti immunomagnetici in precedenza fatti aderire alle membrane.

Il successo del *Comet assay* è dato dalla possibilità di utilizzare anche piccole quantità di cellule e qualunque tipo di tessuto. E' stato infatti utilizzato in studi sul livello basale di danno, età-specifico, al DNA di cellule di cervello (Higami *et al.*, 2004), ma anche nell'induzione e persistenza del danno indotto da agenti chimici in cellule somatiche e germinali di roditori (Croom *et al.*, 1991; Tice *et al.*, 1991; Pool-Zobel *et al.*, 1992; Friend *et al.*, 1993). Sono stati utilizzati un vasto numero di tessuti di roditori: sangue, midollo, cervello, cellule della mucosa gastrointestinale, rene, fegato, polmone, cellule della mucosa nasale, ovari, pelle, milza e testicoli.

L'unica limitazione è quella di riuscire ad ottenere un numero sufficiente di singole cellule senza danneggiarle e prevenendo i processi di riparazione in corso d'opera. Sebbene siano stati utilizzati collagenasi e tripsina per ottenere sospensioni cellulari da tessuti solidi (Pool-Zobel *et al.*, 1992; Betti *et al.*, 1993), anche lo spezzettamento, con un paio di forbici, di un tessuto in un piccolo volume di tampone di Hank's freddo più EDTA fornisce un numero di cellule sufficiente (Tice *et al.*, 1991).

Il *Comet assay* è anche importante negli studi di epidemiologia umana, sia nel rivelare danni al DNA di cellule campionate da individui esposti a livello occupazionale, clinico e ambientale, sia nel valutare differenze nelle capacità di riparazione del DNA fra individui controllo ed esposti. Ampia è stata l'applicazione di questo test anche in campo medico dove sono state analizzate cellule tumorali da pazienti con la malattia di Hodgkin's (Olive *et al.*, 1993), cellule dell'epitelio del cristallino di pazienti con cataratta (Kleiman & Spector 1993), macrofagi alveolari e epitelio polmonare di fumatori (Tice 1995b), cellule tumorali epiteliali della vescica (McKelvey-Martin *et al.*, 1992) e cellule della mucosa gastrica e nasale (Pool-Zobel *et al.*, 1994) oltre a linfociti da

sangue di pazienti con Alzheimer (Kadioglu *et al.*, 2004), cellule dal liquido amniotico per la diagnosi prenatale di *Xeroderma pigmentosum* e tricotiodistrofia (Green *et al.*, 1992; Alapetite *et al.*, 1997). Esistono anche indicazioni che il *Comet assay* alcalino può evidenziare una deficienza nella riparazione del DNA in linfociti di pazienti affetti da lupus eritematoso ed artrite reumatoide (McCurdy *et al.*, 1997). Questo test è anche usato nello studio di tumori solidi in radiobiologia per evidenziare cellule in ipossia (Olive 1999), in quanto l'ossigeno è uno dei principali fattori riconosciuti che modifica il numero di rotture a singolo filamento causate in tessuti tumorali dalle radiazioni ionizzanti (Miyaga *et al.*, 1997). Nello studio del diabete mellito di tipo 2 il *Comet assay* è risultato utile nel misurare un più elevato livello basale di danno e una minore efficienza della capacità di riparazione nel DNA di persone affette da questa malattia (Blasiak *et al.*, 2004).

In studi sulle conseguenze dell'esercizio fisico (Tice *et al.*, 1990; Hartmann *et al.*, 1994), di una sana alimentazione (Green *et al.*, 1994) e sulle conseguenze del fumo sull'infertilità maschile (Arabi 2004) si è fatto uso di questo test che, durante l'ultimo decennio, si è diffuso enormemente in diversi campi e si sta affermando come mezzo standard nell'industria farmaceutica per accertare la sicurezza e l'efficacia di nuovi composti (Wiklund & Agurell 2003).

1.10. Obiettivo della ricerca

L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare gli eventuali danni di tipo genotossico indotti da una esposizione a lungo termine a campi magnetici di 0,65 mT e 50 Hz di topi adulti, maschi e femmine, e di topi neonati esposti durante l'intero periodo della vita intrauterina. Per questo scopo sangue periferico e tessuto cerebrale sono stati analizzati con il *Comet assay*.

E' stato studiato il danno genotossico perché esso potrebbe essere il primo stadio verso la trasformazione della cellula danneggiata in cellula tumorale. Ciò risulta estremamente importante se si considera quanto emerge da alcuni studi epidemiologici i cui risultati sembrano indicare una relazione causale fra l'esposizione a campi elettromagnetici ELF e l'insorgenza di leucemie, soprattutto infantili, e tumori al cervello nella popolazione esposta. L'utilizzo di topi adulti e neonati permette inoltre di ottenere informazioni sulla possibile diversa sensibilità alle radiazioni nei diversi momenti dello sviluppo. Particolarmente interessante a questo riguardo è la scelta di esporre i neonati durante tutto il periodo della gestazione, momento particolarmente critico nella formazione dell'individuo stesso.

E' stato ipotizzato che l'effetto di campi magnetici a bassa frequenza sia di tipo secondario poiché l'energia associata a queste radiazioni non è tale da poter giustificare una loro azione diretta sulla molecola del DNA. Uno dei possibili meccanismi d'azione proposti è che le

radiazioni inducano uno stress ossidativo con formazione di radicali liberi. Partendo da questa ipotesi si è ritenuto opportuno utilizzare il *Comet assay*, in quanto tecnica particolarmente sensibile, proprio nel rilevare anche un danno di tipo ossidativo.

La validità di questo test nel rilevare questo tipo di danno è stata confermata in un lavoro (di cui sono coautrice) condotto, parallelamente a quello sugli effetti dei campi magnetici, presso l'università di Bradford (Department of Biomedical Science, University of Bradford, UK) nel laboratorio della Prof.ssa Anderson. Questo studio si proponeva di indagare gli effetti dell'esposizione, *in vitro*, a diverse concentrazioni di perossido di idrogeno, estrogeno e progesterone sul DNA di linfociti isolati da donatori sani e da pazienti con vitiligine. Poiché alcuni ormoni possono generare specie reattive di ossigeno (Anderson *et al.*, 2003) la catalasi, enzima in grado di metabolizzare il radicale superossido e l'idrossido di idrogeno, è stata utilizzata in questo esperimento per verificare che il possibile danno causato dalle sostanze testate fosse di tipo ossidativo.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Sistemi biologici utilizzati

L'apprendimento della tecnica del *Comet assay* è stata portata avanti con uno studio *in vitro* sugli effetti di tre sostanze, potenzialmente tossiche, (perossido di idrogeno, estrogeno e progesterone) su linfociti umani da donatori sani e pazienti con vitiligine, una malattia caratterizzata dalla scomparsa di melanociti epidermici e follicolari da alcune zone della pelle.

Lo studio degli effetti dell'esposizione a campi magnetici è stato effettuato *in vivo* su animali di laboratorio.

2.1.1 Linfociti umani

Linfociti umani sono stati isolati da campioni di sangue eparinizzato gentilmente forniti dalla Prof.ssa Schallreuter (Department of Biomedical Science, University of Bradford, UK). I campioni di sangue appartenevano a quattro differenti popolazioni:

POPY: pazienti con vitiligine mai sottoposti a trattamento (N = 9)

POPX: pazienti con vitiligine per i quali il trattamento con pseudo-catalasi attivata da UVB (0,15 mJ/cm²) non è risultato efficace (N = 8)

POPA: pazienti con vitiligine che hanno risposto efficacemente al trattamento pseudo-catalasi attivata da UVB (0,15 mJ/cm²) (N = 11)

POPZ: popolazione controllo di donatori sani (N = 7)

I linfociti sono stati isolati dai campioni di sangue eparinizzato utilizzando una sostanza per la separazione dei linfociti (Lymphoprep). Brevemente 15 ml di sangue sono stati diluiti con 13,5 ml di soluzione fisiologica (NaCl al 0,9% in H₂O distillata) e 6 ml di sangue così diluito sono stati fatti stratificare su 3 ml di Lymphoprep. Le cinque provette ottenute sono state centrifugate per 20 minuti (400g) a temperatura ambiente. Con la centrifugazione, Lymphoprep causava l'isolamento dei linfociti dal sangue intero confinandoli in una banda bianca dall'aspetto lattiginoso fra due fasi liquide (plasma e sangue rimanente). Lo strato contenente i linfociti veniva quindi aspirato con una pipetta e lavato in 10 ml di soluzione fisiologica. Dopo essere stati centrifugati per 15 minuti (400g) il sovrantante veniva rimosso e i linfociti congelati lentamente in azoto liquido dopo essere stati risospesi in 90% di siero fetale bovino e 10% di DMSO o usati direttamente dopo l'isolamento. Questi ultimi campioni sono stati utilizzati per assicurarsi che non ci fossero differenze nella risposta tra i linfociti congelati e quelli freschi.

Appena prima dell'uso ogni campione è stato scongelato a temperatura ambiente.

2.1.2 Topi Swiss CD1

I topolini usati nella seconda fase dello studio appartengono ad un ceppo di laboratorio selezionato artificialmente dall'uomo al quale è stato dato il nome Swiss CD1 (Fig. 6). Il ceppo Swiss fu creato, agli inizi degli anni venti, con lo scopo di ottenere animali che presentassero elevate doti di robustezza e resistenza agli stress, per testare la tossicità di molti prodotti farmaceutici. Nei successivi decenni i campi di applicazione scientifica nei quali questi animali venivano usati si sono enormemente ampliati grazie soprattutto ad alcune loro caratteristiche come: l'elevata fertilità (le dimensioni della nidiata sono di 14 o più individui alla volta) e la capacità delle femmine di fungere da "recipienti" per trasferimenti embrionali di differenti linee di topi.

L'originale gruppo di topi Swiss che servirono come progenitori del ceppo CD1 consisteva di due maschi e sette femmine di topo albino che derivavano da un gruppo non-inbred del laboratorio del Dr. De Coulon a Losanna in Svizzera. Successivamente questi animali furono importati, nel 1926, negli Stati Uniti dal Dr. Clara Lynch del Rockefeller Institute.

La sigla CD (clusters of differentiation) si riferisce agli antigeni di differenziazione dei leucociti umani; CD1 designa i linfociti T6 (popolazione dei timociti corticali) (Delfino 1995).

Il ceppo Swiss CD1 è quindi un ceppo outbred, ovvero una linea da laboratorio mantenuta mediante incroci tra soggetti appartenenti a nidiata diverse.

Gli animali, utilizzati nella ricerca eseguita a Roma, sono stati gentilmente messi a disposizione dalla Prof.ssa Rita Canipari e provenivano dallo stabulario del Dipartimento di Istologia ed Embriologia Medica, dell'Università "La Sapienza" di Roma.

In particolare sono stati effettuati due diversi esperimenti: nel primo sono state utilizzate quattro femmine di topo gravide dell'età di quattro mesi; nel secondo sono stati utilizzati tre maschi e tre femmine, di due mesi di età.



Fig. 6: Esemplare di topo Swiss CD1; ceppo utilizzato nell'esperimento *in vivo*.
Fig. 6: Specimen of Swiss CD1, the strain used in the , *in vivo*, experiment

2.2 Trattamento

2.2.1 H_2O_2 , estrogeno, progesterone

I campioni di linfociti sono stati utilizzati, freschi o dopo essere stati scongelati a temperatura ambiente, nel trattamento *in vitro* con H_2O_2 , estrogeno (17 β -estradiolo) e progesterone. Per ogni campione, 100 μ l della sospensione cellulare sono stati aggiunti, da soli o combinati con catalasi (250 U/ml), ad ogni eppendorf contenente una diversa concentrazione di progesterone (0, 10, 50, 75, 100, 150 μ M), estrogeno (0, 25, 50, 75, 100 μ M) e perossido di idrogeno (0, 5, 10, 20, 40, 60 μ M).

L'effetto della catalasi è stato testato su una sola concentrazione delle sostanze utilizzate (75 μ M per l'estrogeno e 60 μ M per l' H_2O_2 ,) ad eccezione del progesterone per il quale la catalasi è stata utilizzata con due concentrazioni (50 e 150 μ M).

Progesterone e estrogeno sono stati sciolti in DMSO e diluiti in PBS [in 1 l: NaCl, 8 gr; KCl, 0,2 gr; Na_2HPO_4 , 1,44 gr; KH_2PO_4 , 0,24 gr] in modo da ottenere una percentuale di solvente (DMSO), in ogni eppendorf, sempre al di sotto dell'1% del volume finale del trattamento. Il perossido d'idrogeno è stato invece diluito in acqua distillata mentre la catalasi è stata sciolta in RPMI 1640. Il volume finale di ogni eppendorf è poi stato portato a 1ml con PBS.

Le cellule sono state quindi incubate per 30 minuti a 37°C.

Al termine dell'incubazione, e subito dopo essere stati scongelati, è stata controllata la vitalità dei linfociti con Tripan blu. La vitalità dei linfociti appena scongelati è stata misurata per assicurare che la procedura di congelamento non li avesse danneggiati. In tutti i casi essa è sempre risultata superiore all'80%.

2.2.2 Campo elettromagnetico

Topi Swiss CD1, maschi, femmine adulte esposte durante il periodo di gestazione e neonati, sono stati esposti a campi magnetici con frequenze ed intensità (50 Hz; 650 μ T) simili a quelle che si possono trovare in ambito domestico e lavorativo (vicino ad elettrodomestici e altiforni).

Per l'esecuzione degli esperimenti erano a disposizione due dei tre solenoidi progettati e realizzati dall'Ingegnere Angelico Bedini e dal perito nucleare Raffaele Palomba dell'I.S.P.E.S.L. di Roma. I solenoidi consistevano in tubi di plastica di 25 cm di diametro e 80 cm di lunghezza circondati da due avvolgimenti di spire, per un totale di 552 spire e quindi 690 spire al metro, di un filo di rame isolato con resistenza di 3 Ohm (Fig. 7). Dei tre solenoidi due sono stati collegati ad alimentatori mentre il terzo è stato utilizzato come solenoide controllo.

Prima dell'inizio di ogni esposizione sono state effettuate misurazioni dell'intensità della radiazione elettromagnetica nei locali prescelti per l'esperimento con tutti i solenoidi spenti

(Tab. 3). E' stata anche calcolata l'intensità del campo magnetico indotto nel solenoide controllo dal campo generato dall'altro solenoide quando quest'ultimo era acceso (Tab. 3).

VALORI DI INTENSITÀ DI CAMPO RISCONTRATI DURANTE LE MISURAZIONI E LA CALIBRAZIONE DEI SOLENOIDI NELLE FASI DI PREPARAZIONE ANTECEDENTI L'ESPOSIZIONE	
Rumore di fondo nell'ambiente	50-60 nT
Intensità di campo magnetico generata da un solenoide acceso	650 μ T
Intensità di campo magnetico indotto nel solenoide controllo dall'accensione contemporanea degli altri due solenoidi	0,3-0,4 μ T

Tab. 3: Grandezze e relativi valori misurati durante la fase preliminare di preparazione dell'ambiente dove sarebbe avvenuta l'esposizione.

Tab. 3: Magnetic field measure obtained prior the animal exposition in the exposure room.

All'inizio di ogni periodo espositivo il solenoide utilizzato per le esposizioni, alimentato da una tensione di 5-6 V, veniva calibrato in maniera tale che il campo generato avesse una frequenza di 50 Hz e intensità di 650 μ T. Nel corso di ogni esposizione i suddetti parametri venivano costantemente controllati. A questo scopo il campo magnetico veniva misurato con un misuratore di campo magnetico (W & G, modello EFA3) all'interno del solenoide acceso ed è sempre risultato costante nei 40-50 cm centrali del tubo. La gabbia che ospitava gli animali da esporre veniva posizionata in questo spazio di campo costante. La disposizione nel solenoide controllo era equivalente ogni volta a quella del solenoide usato per l'esposizione. La temperatura all'interno della stanza di esposizione, dove erano stabulati gli animali, era di 20-25 °C con un'umidità del 40-50%, l'alternanza luce-buio era di 12 h e agli animali erano forniti cibo e acqua *ad libitum*. Il tempo (23 giorni), la frequenza (50 Hz) e l'intensità (650 μ T) di esposizione sono rimasti costanti in tutti gli esperimenti.

Sono stati programmati ed eseguiti due diversi esperimenti.

Il primo esperimento è stato effettuato su animali adulti; tre maschi e tre femmine, di due mesi di età, sono stati esposti a campi magnetici di intensità 650 μ T e frequenza 50 Hz per ventitré giorni. Un altro gruppo di sei topi (tre maschi e tre femmine) è stato utilizzato come gruppo controllo tenuto per ventitré giorni nel solenoide spento.

Per ogni animale metà dei preparati è stato utilizzato per un trattamento con proteinasi K introdotta per evidenziare, nel test del *Comet*, la presenza di crosslinks.

Nel secondo esperimento due topoline adulte gravide di 4 mesi sono state introdotte, al primo giorno di gestazione (considerando come giorno 1 la comparsa del tappo vaginale), ciascuna all'interno di un solenoide. Per l'intero periodo di gestazione più tre o quattro giorni sono state sottoposte al campo magnetico di 50 Hz di frequenza e intensità pari a 650 μ T.

Contemporaneamente altre due femmine gravide sono state usate come controlli e tenute nel solenoide spento esattamente nelle stesse condizioni delle due topine esposte. Per l'esperimento sono stati utilizzati sei piccoli topi di 3-4 giorni d'età scelti a caso dalle nidiate nate dalle madri esposte e sei piccoli della stessa età, sempre scelti a caso e nati dalle madri utilizzate come controlli. Tutti i piccoli, dopo la nascita, sono rimasti per tre giorni rispettivamente insieme alle madri esposte o alle madri di controllo. Il periodo di esposizione post-natale è stato utile per evitare che il prelievo sequenziale dei piccoli, necessario nell'esperimento *in vivo*, comportasse uno shock per la madre non ancora avvezza all'allattamento e pertanto con covata a rischio di infanticidio. Anche in questo esperimento parte dei preparati di ogni animale è stato utilizzato per il trattamento con proteinasi K.

Al termine del periodo di esposizione gli animali di tutti e due gli esperimenti sono stati processati come di seguito riportato.

I topi sono stati addormentati con ghiaccio secco prima di essere sacrificati: in particolare venivano fatti entrare in una scatolina di plastica che era quindi posta in una più grande di polistirolo contenente ghiaccio secco, in modo da evitare il trauma provocato dal contatto diretto dell'animale con il ghiaccio secco.

Una volta addormentati, gli animali venivano pesati e immediatamente sacrificati mediante decapitazione. Si eseguivano quindi i seguenti prelievi:

- sangue periferico, con prelievo dalle vene giugulari.
- cervello.

Le carcasse venivano, infine, fissate in Bouin per eventuali future analisi e approfondimenti.

Per ogni animale è stata compilata una scheda modulare per la segnalazione dei prelievi dei suddetti materiali biologici.

I dati ottenuti relativi alle madri del primo esperimento, quando possibile, sono stati inclusi fra quelli degli adulti.



Fig. 7: Solenoidi, progettati e realizzati dal personale dell'ISPESL nella stanza dove avveniva l'esposizione degli animali.
Fig. 7: The solenoids in the exposure room. The solenoids used in the experiment were planned by the ISPESL engineers

2.3 Metodiche utilizzate

Su tutti i sistemi biologici utilizzati è stato applicato il *Comet assay* per valutare il danno indotto al DNA delle singole cellule dai diversi trattamenti.

Il test è stato eseguito secondo il protocollo standard (Singh & Lai 1998; Tice & Vasquez 1999; Tice *et al.*, 2000).

Le indicazioni e i suggerimenti dati nelle linee guida (Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003) per un adeguato disegno sperimentale nell'applicazione del test sono state tenute in considerazione.

2.3.1 *Comet assay su linfociti*

Sono stati utilizzati vetrini porta oggetto convenzionali precedentemente preparati con uno strato di agarosio (1%, in acqua distillata) lasciato seccare, per almeno tre giorni, a temperatura ambiente.

Subito dopo l'incubazione, le sospensioni cellulari sono state centrifugate (300 g) e 900 µl del sovrantante eliminato. Il pellet è stato nuovamente portato in sospensione in 100 µl di agarosio LMP (1% in PBS) mantenuto sciolto a 37°C. Le sospensioni sono state, quindi, rapidamente distribuite sul vetrino e sparse con un coprioggetto (22 x 40 mm). Il gel è stato fatto solidificare su ghiaccio per 5 minuti. Dopo aver rimosso il coprioggetto, sul vetrino sono stati distribuiti 100 µl di agarosio LMP (0,5% in PBS) e sparsi con un coprioggetto, quindi lasciati solidificare su ghiaccio. Una volta rimossi i vetrini coprioggetto, i preparati sono stati immersi in una soluzione di lisi [2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris con 1% di Triton X-100 e 10% DMSO aggiunti poco prima dell'uso, pH = 10]. Dopo una lisi a 4 °C durata tutta la notte, i vetrini sono stati posti in una vasca da elettroforesi in orizzontale (modello HUZ0, Scie-Plas, Renfrewshire, UK) e immersi nel tampone di elettroforesi [1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH>13]. Sono stati quindi lasciati nel tampone per 30 minuti per permettere lo srotolamento (*unwinding*) del DNA e l'espressione del danno nei siti alcalo-labili. I preparati sono poi stati sottoposti ad elettroforesi a 4 °C per 30 minuti (25 V; 300 mA, forniti da un generatore 2300 Microdriver 1, LKB, Svezia) al buio per prevenire un eventuale danno aggiuntivo al DNA. Al termine dell'elettroforesi i vetrini sono stati neutralizzati mediante tre lavaggi con tampone di neutralizzazione [0,4 M Tris, pH 7,5] per eliminare l'eccesso di alcali. I vetrini sono stati quindi deidratati in metanolo al 70% per 15 minuti e conservati fino al momento della lettura. Poco prima della lettura al microscopio i vetrini sono stati reidratati in acqua distillata per 15 minuti e quindi colorati con 60 µl di bromuro di etidio (2 µg/ml) e chiusi con un coprioggetto (22 x 40 mm).

Il microscopio a fluorescenza (Leica, Germany), utilizzato nella lettura, offriva un ingrandimento di 625 volte, risultanti da un obiettivo 40x, una lente di proiezione 12,5x e una lente oculare 12,5x, montava un filtro di eccitazione di BP546/10 nm e un filtro di barriera di 590 nm ed era collegato con un computer attraverso una telecamera CCD.

Un numero pari a 100 cellule per vetrino, per ogni singola concentrazione, è stato analizzato con un software di analisi di immagine (Komet 4.0). Il valore del danno al DNA era restituito automaticamente in termini di "Tail Moment" calcolato posizionando il nucleo della cellula sul lato sinistro della cella di riferimento usata dal software per la misura. Il settaggio del sistema di misura prevedeva:

soglia per la testa:	2%
soglia per la coda:	0%;
valore di diffusione:	1
altezza del background:	20
lunghezza del taglio della coda:	5

2.3.2 Comet assay su cervello e sangue

Tutto il procedimento di seguito riportato è stato eseguito mantenendo i tessuti a temperatura compresa tra 0 e 4 °C ed in condizioni di luce sempre bassa e indiretta per evitare danni aggiuntivi al DNA.

Cervello

Appena espantato il cervello, sia degli animali adulti che neonati, è stato lavato più volte in tampone fosfato [PBS: NaCl, 8 gr; KCl, 0,2 gr; Na₂HPO₄, 1,44 gr; KH₂PO₄, 0,24 gr, pH 7,4] freddo per eliminare il sangue e pulito dalla sostanza bianca. Il tessuto veniva quindi spezzettato con l'aiuto di un bisturi e dissociato meccanicamente pipettandolo con pipette di calibro via via minore. La sospensione così ottenuta è stata lasciata riposare, in ghiaccio, per 2 minuti per permettere al tessuto di depositare sul fondo del tubo da centrifuga. Il sovrantante veniva quindi eliminato e il pellet risospeso in 550 µl di PBS freddo. La sospensione veniva quindi filtrata con filtro a maglia da 70 µm in un nuovo tubo da centrifuga ed utilizzato nel *Comet assay*.

Sangue

Il sangue veniva prelevato con una pipetta eparinizzata subito dopo la decapitazione dell'animale e utilizzato nel *Comet assay*.

Comet assay

Sono stati utilizzati vetrini porta oggetto convenzionali precedentemente preparati con uno strato di agarosio (1%, in acqua distillata) lasciato seccare, per almeno tre giorni, a temperatura ambiente.

Le sospensioni cellulari, 20 µl di sangue e 100 µl di sospensione di tessuto cerebrale, venivano mescolate con 100 µl di agarosio LMP (1% in PBS) mantenuto sciolto a 37 °C.

Le sospensioni sono state, quindi, rapidamente, distribuite sul vetrino e sparse con un coprioggetto (22 x 40 mm). Il gel è stato fatto solidificare su ghiaccio per 5 minuti. Dopo aver rimosso il coprioggetto, 100 µl di agarosio LMP (0,5% in PBS) sono stati distribuiti sul vetrino e lasciati solidificare su ghiaccio. Una volta rimossi i vetrini coprioggetto, i preparati sono stati immersi in una soluzione di lisi [2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris con 1% di Triton X-100 e 10% DMSO aggiunti poco prima dell'uso, pH = 10]. Dopo una lisi a 4 °C durata tutta la notte, i vetrini sono stati posti in una vasca da elettroforesi in orizzontale e immersi nel tampone di elettroforesi [1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH>13]. Sono stati quindi lasciati nel tampone per 30 minuti per permettere lo srotolamento (*unwinding*) del DNA e l'espressione del danno nei siti alcalo-labili. I preparati sono poi stati sottoposti ad elettroforesi a 4 °C per 30 minuti (25 V; 300 mA), al buio per prevenire un eventuale danno aggiuntivo al DNA. Al termine della corsa elettroforetica i vetrini sono stati neutralizzati mediante tre lavaggi con tampone di neutralizzazione [0,4 M Tris, pH 7,5] per eliminare l'eccesso di alcali. I vetrini sono stati quindi deidratati in metanolo al 70% per 15 minuti e conservati fino al momento della lettura. Poco prima della lettura al microscopio i vetrini sono stati reidratati in acqua distillata per 15 minuti e quindi colorati con 60 µl di bromuro di etidio (2 µg/ml) e chiusi con un vetrino coprioggetto (22 x 40 mm).

Comet assay per evidenziazione di cross-links.

Seguendo quanto evidenziato in alcuni esperimenti condotti da Lai & Singh (1997) e Singh & Lai (1998) è stato introdotto nel protocollo del *Comet assay* l'uso della proteinasi K per testare se l'esposizione a campi magnetici potesse causare la formazione di crosslinks nel DNA.

L'induzione di crosslinks sia DNA-DNA che DNA-proteina riduce, durante l'elettroforesi, la capacità del DNA di migrare all'interno del gel a qualunque pH. Questi due tipi di crosslinks possono essere distinti incubando il DNA dopo la lisi e prima dell'elettroforesi con proteinasi K al fine di rimuovere le proteine che, legandosi al DNA, sono responsabili della presenza dei crosslinks (Tice *et al.*, 2000). L'esposizione del DNA alla proteinasi K riduce o elimina i crosslinks DNA-proteina mentre non ha alcun effetto sui crosslinks DNA-DNA (Merk & Speit 1998). La completa o parziale perdita dei crosslinks DNA-proteina permette al DNA di esibire,

nell'elettroforesi, un tasso di migrazione uguale o comunque molto simile a quello del DNA delle cellule controllo (Tice *et al.*, 2000).

Quindi, in questo caso, in presenza di crosslinks DNA-proteina probabilmente indotti dall'esposizione ai campi elettromagnetici, il livello di danno registrato nei campioni non trattati con proteinasi K dovrebbe essere minore di quello presente nelle cellule del gruppo controllo, mentre quello misurato nei campioni trattati con proteinasi K dovrebbe risultare maggiore sia di quello presente nelle cellule del gruppo controllo che in quelle del gruppo non trattato con proteinasi K.

In pratica al termine della lisi due vetrini per ogni animale sono stati trattati con proteinasi K seguendo le indicazioni di Merk *et al.* (2000). Dopo la lisi i vetrini sono stati lavati tre volte, per 5 minuti, in tampone TE [10 mM Tris, 1 mM Na₂EDTA, pH 10]. Un'aliquota di 100 µl di soluzione contenente la proteinasi K (1 mg/ml in tampone TE) è stata quindi messa su ciascun vetrino che veniva poi ricoperto con un coprioggetto in modo che la proteinasi K si spandesse omogeneamente su tutto il preparato. I vetrini venivano quindi incubati in una camera umida a 37 °C per 2 h. Al termine dell'incubazione i coprioggetto venivano eliminati e i preparati sottoposti al periodo di srotolamento (*unwinding*) del DNA e quindi ad elettroforesi, come precedentemente descritto per i campioni di cervello e sangue non trattati con proteinasi K. Anche questi preparati, come gli altri sono stati deidratati in metanolo al 70% e conservati a temperatura ambiente fino al momento della lettura. Poco prima della lettura al microscopio i vetrini sono stati reidratati in acqua distillata per 15 minuti e quindi colorati con 60 µl di bromuro di etidio (2 µg/ml) e chiusi con un coprioggetto (22 x 40 mm).

Per ogni animale sono stati preparati quattro vetrini per ciascun tessuto (due trattati con proteinasi K e due non trattati). Sono state lette 50 cellule per ogni vetrino per un totale di 100 cellule per animale per tessuto.

La lettura dei preparati è stata eseguita mediante un microscopio a fluorescenza Leica DMRB collegato a una telecamera High Performance CCD Camera COHU presso il laboratorio della Prof.ssa Renata Cozzi, (Dipartimento di Biologia, Università "Roma Tre" di Roma). L'ingrandimento utilizzato durante la lettura era di 200 volte, dato dall'ingrandimento dell'obiettivo 20X per quello degli oculari 10X.

L'acquisizione di immagini e il successivo calcolo di alcuni parametri delle comete utili per quantificare il danno subito dal DNA delle cellule è stato reso possibile grazie ad un programma automatico di analisi di immagine, I.A.S. versione 0.05, della Delta Sistemi (Roma) collegato al microscopio.

2.4 Analisi d'immagine

L'immagine restituita dal microscopio, durante la lettura dei preparati, è quella di figure luminose, dovute alla colorazione con il fluorocromo bromuro di etidio, simili a quelle riportate in figura 8.

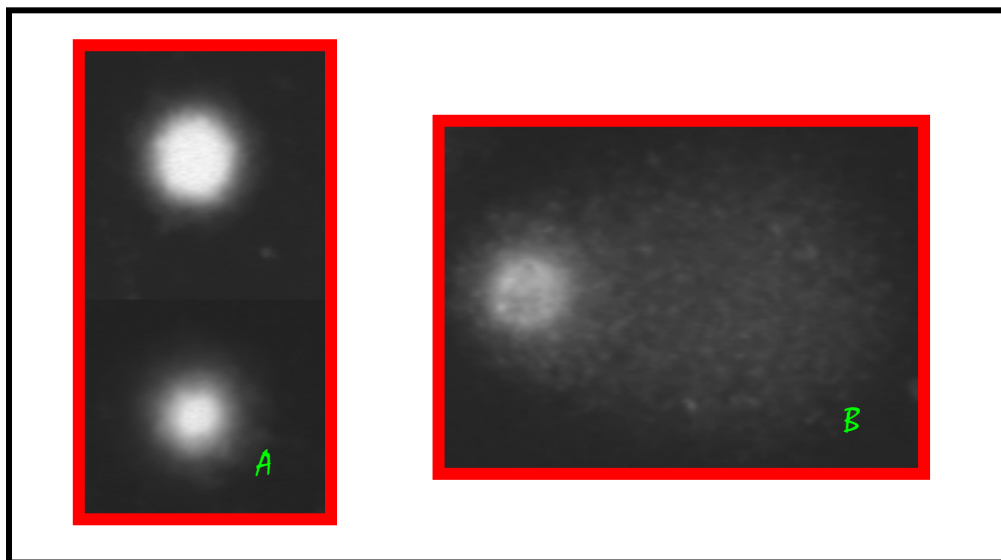


Fig. 8: Tipiche immagini di comete. Nella parte A della figura sono rappresentate comete di cellule di cervello con DNA non danneggiato dal gruppo controllo. Nella parte B si può, invece, osservare un'immagine, assimilabile a quella di una cometa, di una cellula con DNA danneggiato i cui frammenti sono migrati, durante l'elettroforesi a formare la coda della cometa stessa.

Figure 8: Typical comets images. Nucleus from brain cells of control group with no DNA damage are shown in part A. Part B shows, instead, a comet-like image from a cell with damaged DNA. After migration it looks like a comet tail.

La luminescenza rappresenta il DNA delle singole cellule. Quando il DNA non è danneggiato, non migra durante l'elettroforesi e forma delle immagini tondeggianti come quelle del nucleo cellulare (Fig. 8A). I frammenti del DNA di una cellula danneggiata, invece, migrano verso il polo positivo durante l'elettroforesi. L'immagine visualizzata, in questo caso, sarà simile a quella di una cometa (Fig. 8B) nella quale si riconosce una testa (la parte più luminosa) che rappresenta l'originale nucleo cellulare, dove è presente la maggior parte del DNA, e una coda formata dai frammenti del DNA migrato.

Dalle immagini ottenute sono stati calcolati diversi parametri attraverso l'aiuto del software per l'analisi d'immagine che si basa fundamentalmente sulla divisione della cometa analizzata in una testa e in una coda la cui luminescenza viene confrontata con quella del fondo (Fig. 9).

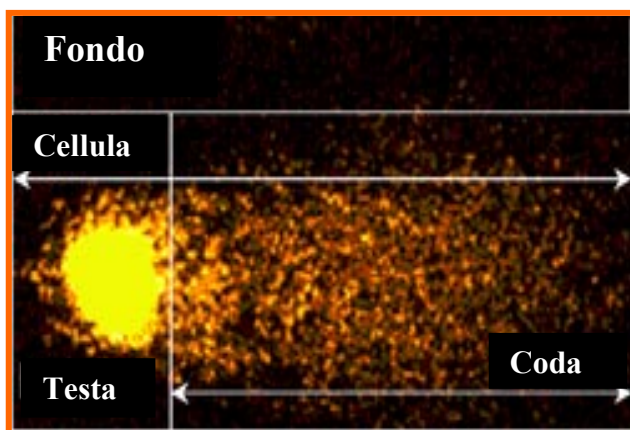


Fig. 9: Immagine di una cometa con in evidenza gli elementi considerati dai software di analisi d'immagine.
Fig. 9: Comet image showing the components analysed by the image analysis software.

2.5 Parametri analizzati

I parametri più frequentemente utilizzati per quantificare il danno al DNA con il *Comet assay*, possono essere divisi in due categorie in base al tipo di lettura: una lettura dei preparati non computerizzata e una basata sull'utilizzo di software di analisi di immagine (Tab. 4).

In questo studio sono stati utilizzati parametri relativi ad una lettura computerizzata dei preparati.

Parametri	Descrizione	Commenti
% di cellule danneggiate	Si basa sul numero di cellule con coda contro quelle che non l'hanno	E' il metodo più semplice di raccolta dati. Non dipende da un'analisi di immagine. E' limitato al rilevamento di forti effetti e non da' informazioni sull'ammontare del danno.
% di cellule con coda assente, corta, media e lunga (Anderson <i>et al.</i> , 1994; Gedik <i>et al.</i> , 1992).	Basato sulla divisione in categorie di danno	La divisione in categorie, come il numero delle categorie usate è del tutto arbitraria. Non utile per l'analisi di piccoli effetti. Non dipende da un'analisi di immagine
Lunghezza del DNA migrato (Tail length, TL) o rapporto fra lunghezza e ampiezza della coda (Jostes <i>et al.</i> , 1993) o fra ampiezza e lunghezza (Fairbairn <i>et al.</i> , 1993)	Sensibile nel rilevare un danno leggero, fa riferimento ai più piccoli frammenti di DNA migrati. E' generalmente riportata in μm e dovrebbe essere proporzionale all'estensione del danno.	Dovrebbero essere standardizzati i metodi di identificazione dei bordi della cometa. Ma Vijayalaxmi <i>et al.</i> (1992) lo indicano come il miglior parametro nel <i>comet</i> alcalino ($\text{pH}>13$). E' stato misurato in molte maniere differenti: utilizzando un micrometro inserito nell'obiettivo del microscopio o con programmi computerizzati di analisi di immagine.
% di DNA migrato (Olive <i>et al.</i> , 1990) o rapporto fra DNA nella coda e DNA nella testa (Muller <i>et al.</i> , 1994)	E' una misura di danno totale, indicato da Collins (1996) come il miglior parametro per descrivere il danno subito dalle cellule.	Assume che l'efficienza del colorante nel mettere in evidenza il DNA migrato e quello non migrato sia la stessa. Assunto non sempre rispettato perfettamente. Usa programmi computerizzati di analisi di immagine.
Momento della coda (Tail Moment, TM)	Mette in relazione la lunghezza della coda e la % di DNA migrato (o intensità della coda). Introdotta da Olive <i>et al.</i> (1990)	E' stato proposto come il miglior parametro per calcolare il danno ad DNA. Si perdono alcune utili informazioni sulla relazione fra la lunghezza della coda e la % di DNA migrato. Infatti alcune sostanze (radiazioni ionizzanti) inducono code lunghe e strette mentre altre (ciclofosfoammide) corte e ampie.

Tab. 4: I parametri utilizzati per quantificare i danni al DNA con il *Comet assay* possono essere divisi in due gruppi in base al tipo di lettura, non computerizzata (riportati nella parte alta della tabella) e computerizzata (descritti, in tabella, nella parte finale).

Tab. 4: The parameters used to quantify the damage in the DNA with the Comet assay can be divided in two group: the first based on a non computerised scoring of the slides and the second one based on image analysis software

Nell'analisi dei risultati relativi alla sperimentazione *in vitro* sui linfociti è stato scelto come parametro il Tail Moment, parametro riassuntivo, definito come la distanza migrata dal DNA moltiplicata per la frazione di DNA nella coda della cometa.

Mentre per riassumere i dati relativi agli effetti dei campi magnetici, oltre al Tail Moment sono stati considerati anche il Tail Length (TL), che misura la lunghezza del DNA migrato nella coda e riportato in μm , e la percentuale di DNA nella coda (%DNA), ovvero il rapporto fra il DNA presente nella coda e quello totale della cellula.

Al termine dell'analisi d'immagine si sono ottenuti per ogni cellula i valori dei parametri scelti, ovvero tanti valori quante sono state le cellule contate per ogni individuo.

Questi valori sono stati analizzati a due differenti livelli. Inizialmente per ogni individuo è stata calcolata la media, parametro per parametro, delle cellule contate per quell'individuo. Per ogni

gruppo è stata calcolata la media, per ognuno dei tre parametri, dei valori medi ottenuti nei singoli individui di ciascun gruppo. Queste prime operazioni sono state effettuate sui dati di ambedue gli esperimenti. Tuttavia, poiché l'analisi statistica effettuata sui valori medi non tiene conto della variabilità della risposta delle singole cellule, l'analisi dei dati relativi agli effetti dei campi magnetici è stata approfondita. Infatti, poiché una delle caratteristiche del *Comet assay* è quella di misurare la risposta delle singole cellule, per non perdere questa informazione, ogni gruppo è stato considerato come composto da tutte le cellule analizzate per ognuno degli individui del gruppo stesso. Sono state quindi calcolate, per ogni parametro, le medie aritmetiche dei valori di tutte le seicento cellule contate per quel gruppo.

2.6 Analisi Statistica

Il problema dell'analisi statistica dei dati prodotti con il *Comet assay* ha ricevuto molta attenzione (Lovell *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000); tuttavia non è stato trovato un accordo sui metodi statistici da usare (Duez *et al.*, 2003) e le raccomandazioni pubblicate in differenti lavori o linee guida (Lovell *et al.*, 1999; Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003) sono a tutt'oggi molto generali (Wiklund & Agurell 2003). Le misure effettuate dal computer a livello cellulare, ma anche quelle effettuate con una lettura visiva, forniscono, inevitabilmente, dati che presentano una dispersione più o meno grande e per i quali non sono ancora stati proposti metodi di trattamento davvero soddisfacenti (Lovell *et al.*, 1999; Duez *et al.*, 2003). Pertanto è sembrato opportuno analizzare i dati ottenuti sia a livello di gruppo che di singole cellule.

In entrambi gli esperimenti si è utilizzato il test Shapiro Wilk's per verificare che i dati fossero distribuiti normalmente. Quelli che non presentavano una distribuzione normale sono stati trasformati attraverso la funzione logaritmica corretta per la presenza di valori pari a zero ($\log_{10}+0,001$). Se i valori così trasformati risultavano distribuiti normalmente, le differenze fra le medie dei gruppi erano analizzate con il test parametrico t di Student. Quando la distribuzione dei dati non risultava normale neanche dopo la trasformazione, è stato scelto per l'analisi statistica il test non parametrico Kruskal-Wallis.

Il test χ^2 è stato utilizzato per verificare la presenza di differenze significative nella percentuale di cellule sane (considerate con valore di almeno uno dei tre parametri pari a zero) nelle diverse popolazioni.

3. RISULTATI

3.1 Cervello

3.1.1 Cervello adulti.

I valori medi, per i singoli individui del gruppo controllo e del gruppo esposto, dei tre parametri scelti per descrivere il danno al DNA delle cellule di cervello, il Tail Moment (TM), la percentuale di DNA nella coda (%DNA) e la Lunghezza della coda (TL), sono riportati nella tabella 5 e rappresentati in diagrammi di dispersione (Figg. 10, 11, 12).

Si nota come i valori di TM, %DNA, TL per gli individui esposti sono tendenzialmente distribuiti nella parte alta dei grafici, indicando valori generalmente più elevati rispetto a quelli degli individui del gruppo controllo che invece risultano concentrati nella parte inferiore in concomitanza con valori più bassi dei tre parametri. Questo è più evidente per i parametri del Tail Moment e della % di DNA nella coda (vedi figure 10 e 11).

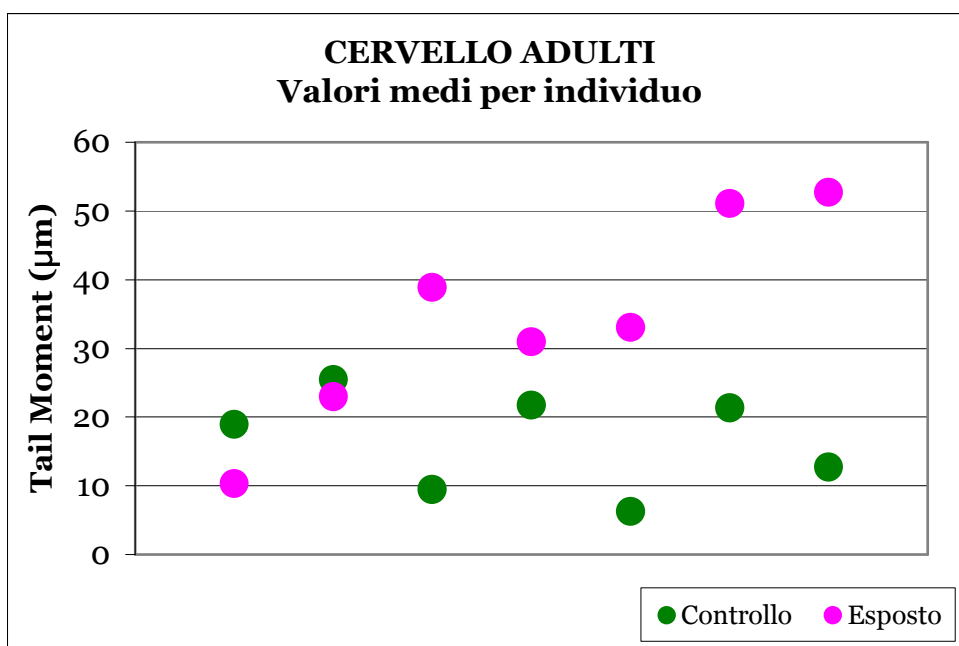


Fig. 10: Comet assay sul cervello degli animali adulti: grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio di Tail Moment (µm) per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.

Fig. 10: Comet assay on brain cells from the adult animals: scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Moment (µm) per each individual of the control and exposed group.

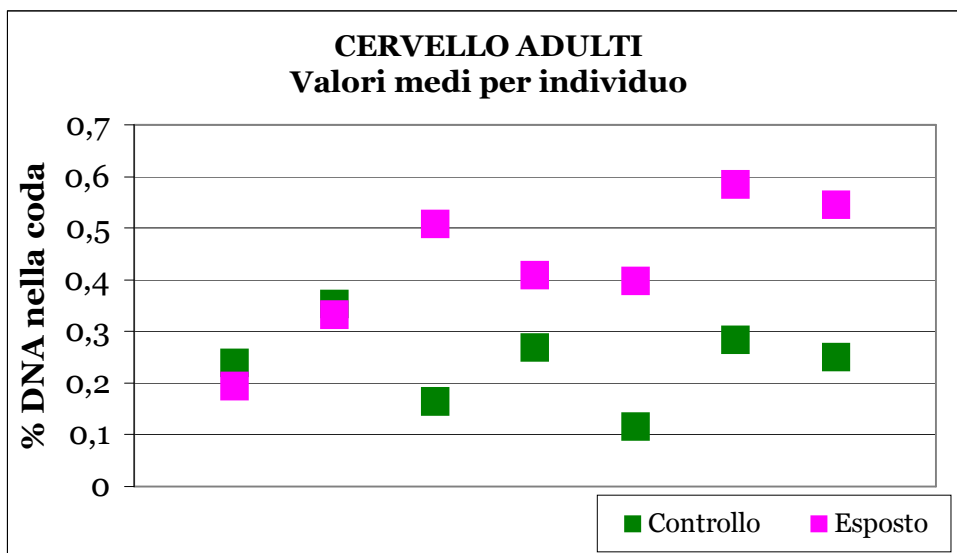


Fig. 11: Comet assay sul cervello degli animali adulti: grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio della % di DNA nella coda per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.
Fig. 11: Comet assay on brain cells from the adult animals: scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of the % of DNA in the tail per each individual of the control and exposed group.

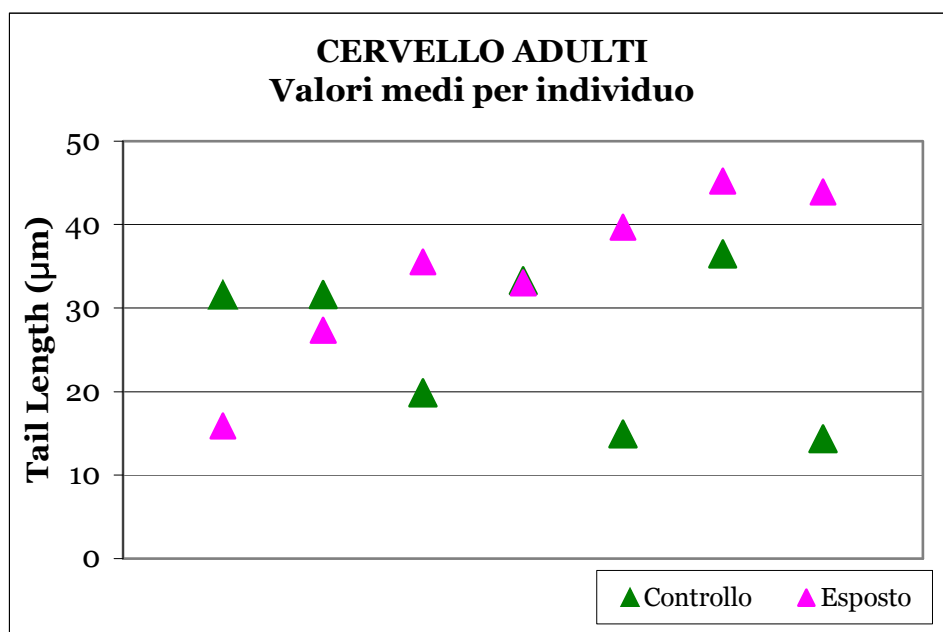


Fig. 12: Comet assay sul cervello degli animali adulti: grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio di Tail Length (µm) per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.
Fig.12: Comet assay on brain cells from the adult animals: scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Length (µm) per each individual of the control and exposed group.

CERVELLO ADULTI Medie per individuo

Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1	100	18,93	10,10	20,15	2,02	0,00	96,21
AD2	100	25,49	25,48	15,22	1,52	0,00	69,09
AD3	100	9,43	7,40	8,14	0,81	0,19	31,96
AD4	100	21,74	12,08	22,88	2,29	0,00	95,94
AD5	100	6,32	4,09	6,76	0,68	0,02	37,52
AD6	100	21,36	17,94	16,61	1,66	0,01	75,27
AD7	100	12,71	18,09	0,00	81,20	1,84	4,83
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1	100	0,24	0,21	0,17	0,02	0,00	0,72
AD2	100	0,35	0,39	0,17	0,02	0,00	0,64
AD3	100	0,16	0,15	0,10	0,01	0,01	0,39
AD4	100	0,27	0,24	0,18	0,02	0,00	0,70
AD5	100	0,12	0,10	0,09	0,01	0,00	0,46
AD6	100	0,28	0,28	0,16	0,02	0,00	0,62
AD7	100	0,25	0,21	0,21	0,02	0,00	0,87
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1	100	31,59	27,06	22,96	2,30	0,00	94,30
AD2	100	31,65	33,21	12,99	1,30	0,00	59,04
AD3	100	19,87	19,07	12,53	1,25	2,05	55,35
AD4	100	33,31	25,42	26,39	2,64	0,00	93,89
AD5	100	14,93	11,48	10,78	1,08	0,82	50,43
AD6	100	36,50	34,44	20,38	2,04	1,23	86,10
AD7	100	14,35	16,38	0,00	78,72	1,66	7,79
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1	100	16,43	15,80	8,97	0,90	0,03	41,46
ADM2	100	18,70	20,39	9,99	1,00	0,00	45,32
ADM3	100	33,76	31,16	15,91	1,59	0,00	80,23
ADM4	100	35,27	36,82	20,35	2,03	0,00	112,00
ADM5	100	38,20	38,98	20,05	2,01	0,00	89,53
ADM6	100	26,88	26,63	12,11	1,21	0,00	57,43
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1	100	0,26	0,26	0,12	0,01	0,00	0,58
ADM2	100	0,29	0,31	0,13	0,01	0,00	0,53
ADM3	100	0,43	0,44	0,14	0,01	0,00	0,67
ADM4	100	0,44	0,49	0,22	0,02	0,00	0,97
ADM5	100	0,45	0,47	0,19	0,02	0,00	0,78
ADM6	100	0,40	0,40	0,17	0,02	0,00	0,76
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1	100	21,54	21,73	7,92	0,79	0,41	38,95
ADM2	100	21,55	21,53	10,33	1,03	0,00	53,71
ADM3	100	36,56	30,34	18,51	1,85	0,00	86,92
ADM4	100	36,45	40,18	16,24	1,62	0,00	72,98
ADM5	100	42,03	45,10	14,73	1,47	0,00	68,06
ADM6	100	24,51	25,01	9,32	0,93	0,00	46,33

CERVELLO ADULTI (con proteinasi K) Medie per individuo							
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1 K	100	31,33	29,72	24,44	2,44	0,01	125,72
AD2 K	100	52,43	59,71	32,69	3,27	0,11	114,08
AD3 K	100	15,08	11,88	12,64	1,26	0,00	44,37
AD4 K	100	19,68	16,65	16,55	1,66	0,00	73,62
AD5 K	100	13,12	11,80	10,95	1,09	0,01	54,53
AD6 K	100	20,40	18,91	14,81	1,48	0,04	64,03
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1 K	100	0,36	0,36	0,22	0,02	0,00	0,78
AD2 K	100	0,53	0,61	0,26	0,03	0,00	0,88
AD3 K	100	0,22	0,20	0,14	0,01	0,00	0,50
AD4 K	100	0,26	0,27	0,18	0,02	0,00	0,66
AD5 K	100	0,21	0,22	0,14	0,01	0,00	0,63
AD6 K	100	0,28	0,31	0,16	0,02	0,00	0,61
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1 K	100	37,77	41,82	20,60	2,06	0,82	118,49
AD2 K	100	50,54	58,02	22,57	2,26	2,87	95,53
AD3 K	100	26,87	27,47	16,88	1,69	0,00	63,55
AD4 K	100	28,27	31,98	18,05	1,80	0,00	68,06
AD5 K	100	21,89	22,14	12,42	1,24	1,23	58,22
AD6 K	100	32,89	35,67	16,56	1,66	1,23	62,73
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1 K	100	16,43	15,80	8,97	0,90	0,03	41,46
ADM2 K	100	18,70	20,39	9,99	1,00	0,00	45,32
ADM3 K	100	33,76	31,16	15,91	1,59	0,00	80,23
ADM4 K	100	35,27	36,82	20,35	2,03	0,00	112,00
ADM5 K	100	38,20	38,98	20,05	2,01	0,00	89,53
ADM6 K	100	26,88	26,63	12,11	1,21	0,00	57,43
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1 K	100	0,26	0,26	0,12	0,01	0,00	0,58
ADM2 K	100	0,29	0,31	0,13	0,01	0,00	0,53
ADM3 K	100	0,43	0,44	0,14	0,01	0,00	0,67
ADM4 K	100	0,44	0,49	0,22	0,02	0,00	0,97
ADM5 K	100	0,45	0,47	0,19	0,02	0,00	0,78
ADM6 K	100	0,40	0,40	0,17	0,02	0,00	0,76
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1 K	100	21,54	21,73	7,92	0,79	0,41	38,95
ADM2 K	100	21,55	21,53	10,33	1,03	0,00	53,71
ADM3 K	100	36,56	30,34	18,51	1,85	0,00	86,92
ADM4 K	100	36,45	40,18	16,24	1,62	0,00	72,98
ADM5 K	100	42,03	45,10	14,73	1,47	0,00	68,06
ADM6 K	100	24,51	25,01	9,32	0,93	0,00	46,33

Tab. 5: Comet assay sul cervello degli animali adulti. Per ognuno dei tre parametri analizzati sono riportati, per ciascun individuo: sigla identificativa, numero di cellule contate per individuo (N), il valore medio (X) e la mediana del parametro, la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio, il valore minimo e massimo.

Tab. 5: Comet assay on brain cells from the adult animals. For each analysed parameters the animal's code, the number of counted cells per animal (N), the mean (X) and median values, the standard deviation (SD) and the standard error (SE) of means, the minimum and maximum value for each animal involved in the experiment are shown.

I valori medi dei tre parametri per ognuno dei quattro gruppi utilizzati negli esperimenti: gruppo controllo, gruppo esposto, gruppo controllo trattato con proteinasi K (controllo K), gruppo esposto trattato con proteinasi K (esposto K), riportati in tabella 6 mostrano che i valori medi del

CERVELLO ADULTI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	7	16,57	7,14	2,69	6,32	25,49
Esposto	7	34,29 ^a	15,05	5,69	10,29	52,72
Controllo K	6	25,34	14,70	6,00	13,12	52,43
Esposto K	6	28,21	9,07	3,70	16,43	38,20
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	7	0,24	0,08	0,03	0,11	0,35
Esposto	7	0,42 ^b	0,13	0,05	0,19	0,58
Controllo K	6	0,31	0,12	0,05	0,21	0,53
Esposto K	6	0,38	0,08	0,03	0,26	0,45
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	7	26,03	9,33	3,53	14,34	36,50
Esposto	7	34,38	10,26	3,88	15,89	45,17
Controllo K	6	33,04	10,14	4,14	21,88	50,54
Esposto K	6	30,44	8,96	3,66	21,54	42,03

Tab. 6: *Comet assay* sul cervello degli animali adulti. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length) il numero di individui per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per i quattro gruppi considerati.

a=p<0,05 b=p<0,01

TM, %DNA: Esposto>Controllo

Tab. 6: Comet assay on brain cells from the adult animals. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA in the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of individual per group (N), the mean value (X), standard deviations (SD) and standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

a=p<0,05 b=p<0,01

TM, %DNA: Exposed (Esposto)>Control (Controllo)

Tail Moment e della percentuale di DNA del gruppo esposto (Tab. 6 e Figg. 13, 14) sono significativamente più elevati rispetto a quelli del gruppo di controllo (rispettivamente: t=2,81; p=0,016; t=3,14; p=0,008). I valori medi di Tail Length non mostrano invece differenze significative confermando la tendenza osservata nei diagrammi di dispersione.

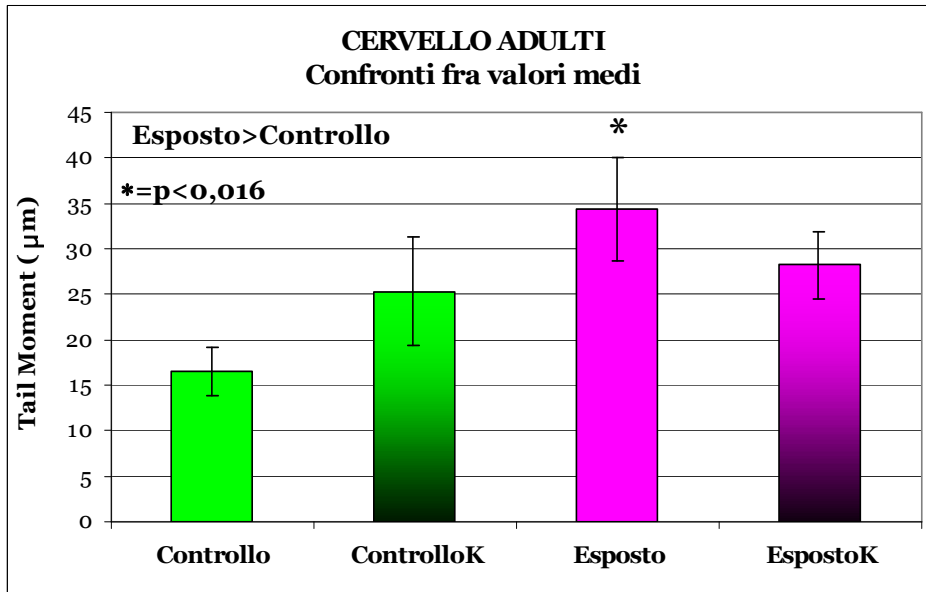


Fig. 13: Comet assay sul cervello degli animali adulti. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi di Tail Moment (μm) per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

* = $p < 0,05$ Esposto > Controllo

Fig 13: Comet assay on brain cells from the adult animals. Comparison between the mean values of Tail Moment (μm) of each of the four analysed groups.

* = $p < 0,05$ Exposed (Esposto) > Control (Controllo)

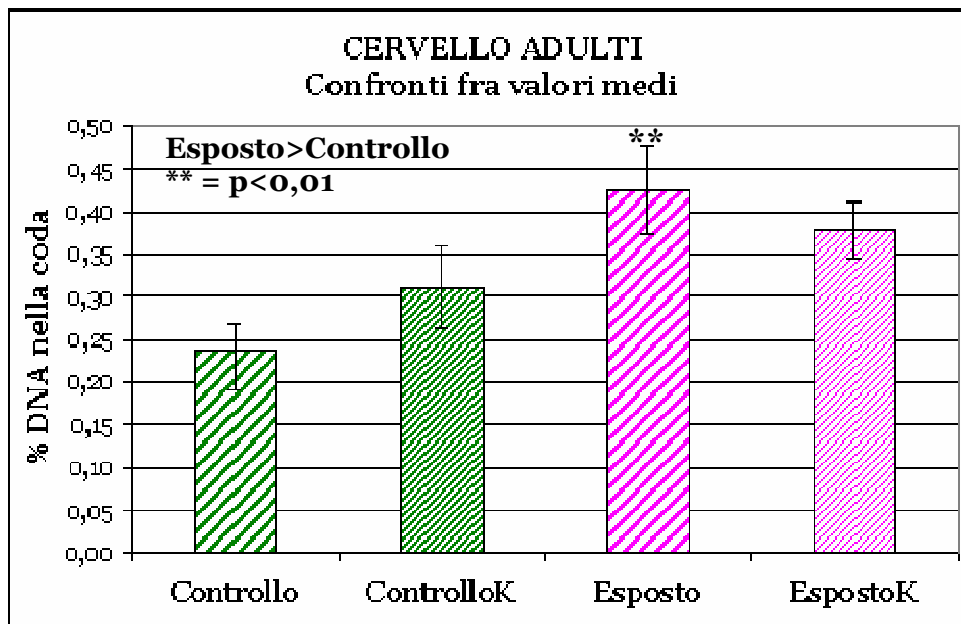


Fig. 14: Comet assay sul cervello degli animali adulti. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi della % di DNA nella coda per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

** = $p < 0,01$ Esposto > Controllo

Fig 14: Comet assay on brain cells from the adult animals. Comparison between the mean values of the % of DNA in the tail of each of the four analysed groups.

** = $p < 0,01$ Exposed (Esposto) > Control (Controllo)

I valori medi dei tre parametri nei due gruppi di controllo (con e senza trattamento con proteinasi K) non mostrano tra loro differenze significative (TM: $t=1,40$, $p=0,19$; %DNA: $t=1,31$, $p=0,22$; TL: $t=1,30$, $p=0,22$), pertanto l'uso della proteinasi K non modifica la risposta del test.

Inoltre non si osserva una differenza statisticamente significativa fra il valore medio del gruppo esposto trattato con proteinasi K e quello del gruppo esposto non trattato, per tutti e tre i parametri analizzati (TM: $t=0,86$, $p=0,41$; %DNA: $t=0,72$, $p=0,48$; TL: $t=0,73$, $p=0,48$).

Nella figura 15, sono rappresentate le distribuzioni dei valori di Tail Moment per tutte le singole cellule del cervello analizzate per il gruppo controllo (N=700) e il gruppo esposto (N=700).

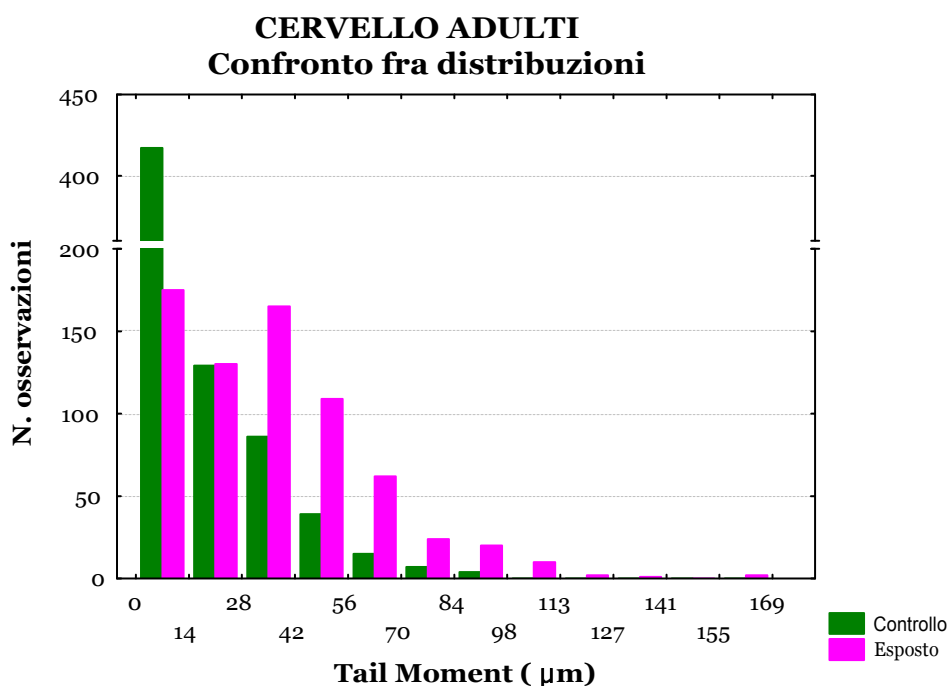


Fig. 15: Comet assay sul cervello degli animali adulti. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Moment riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Moment in μm .

Fig. 15: Comet assay on brain cells from the adult animals. Comparison of frequency distribution of Tail Moment of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Moment values, in μm , are reported on the x axis.

Si osserva che la distribuzione dei valori di Tail Moment delle cellule del gruppo esposto è spostata sul lato destro del grafico, ovvero è presente un maggior numero di cellule con valori elevati (danno maggiore) rispetto a quello del gruppo controllo.

Osservazione analoga può essere fatta analizzando i grafici delle distribuzioni per i parametri percentuale di % DNA nella coda (Fig. 16) e Tail Length (Fig. 17).

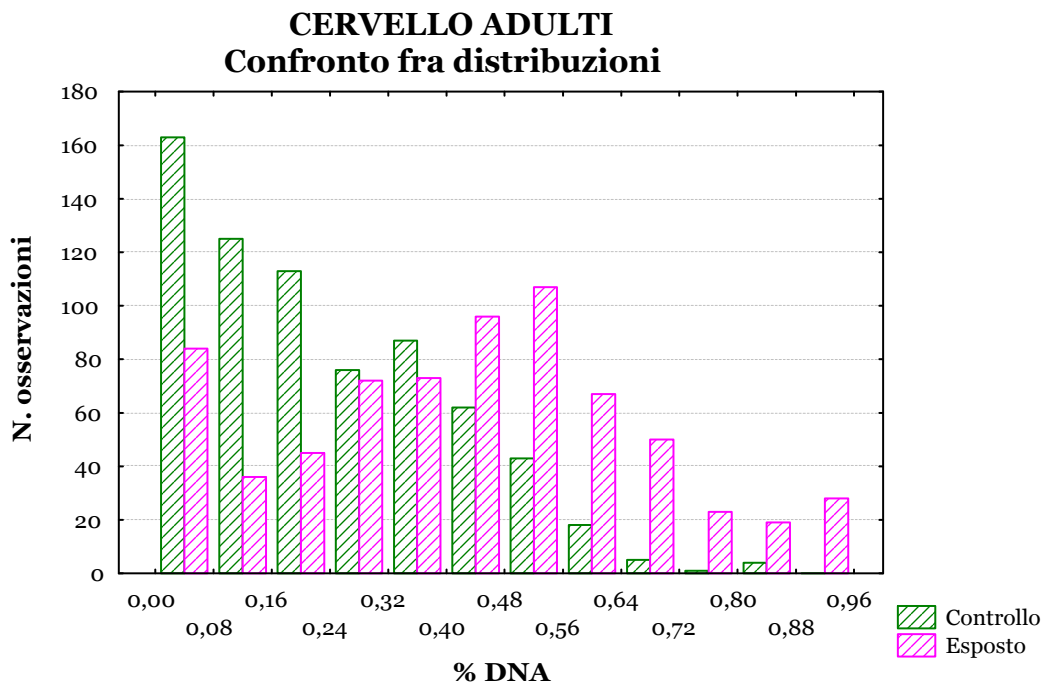


Fig. 16: Comet assay sul cervello degli animali adulti. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori della % di DNA nella coda riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore della % di DNA nella coda.

Fig. 16: Comet assay on brain cells from the adult animals. Comparison of frequency distribution of the % of DNA in the tail of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the % of DNA values are reported on the x axis.

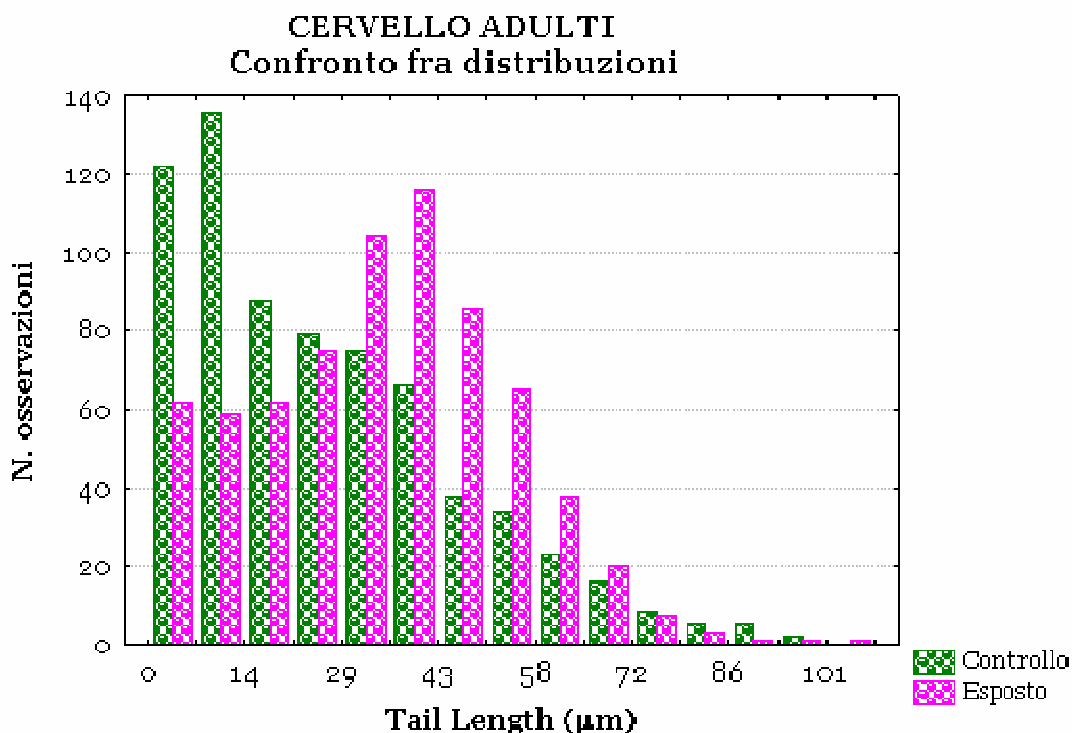


Fig. 17: Comet assay sul cervello degli animali adulti. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori del Tail Length riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Length in µm.

Fig. 17: Comet assay on brain cells from the adult animals. Comparison of frequency distribution of Tail Length of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Length values, in µm, are reported on the x axis.

CERVELLO ADULTI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	700	16,58	17,59	0,67	0	96,21
Esposto	700	34,29 ^b	25,98	0,98	0	168,75
Controllo K	600	25,34	24,15	0,99	0	125,72
Esposto K	600	28,21 ^b	17,30	0,70	0	112
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	700	0,24	0,18	0,01	0	0,87
Esposto	700	0,42 ^b	0,24	0,01	0	0,96
Controllo K	600	0,31	0,22	0,01	0	0,88
Esposto K	600	0,38 ^b	0,18	0,01	0	0,97
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	700	26,08	20,19	0,76	0	94,3
Esposto	700	34,38 ^b	18,44	0,70	0	107,83
Controllo K	600	33,04	20,29	0,83	0	118,49
Esposto K	600	30,44 ^{ab}	15,67	0,64	0	86,92

Tab. 7: Comet assay sul cervello dei topi adulti. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length), il numero di cellule contate per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per le cellule dei quattro gruppi considerati.

a=p<0,05 b=p<0,001

TM, %DNA, TL: Esposto>Controllo

TM, %DNA, TL: EspostoK>ControlloK

TM, %DNA, TL: EspostoK>Esposto

Tab. 7: Comet assay on brain cell from the adult mice. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA of the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of counted cells per groups (N), the mean value (X), standard deviation (SD), standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

a=p<0,05 b=p<0,001

TM, %DNA, TL: Exposed (Esposto)>Control (Controllo)

TM, %DNA, TL: ExposedK (EspostoK)>ControlK (ControlloK)

TM, %DNA, TL: ExposedK (EspostoK)>Exposed (Esposto)

I risultati ottenuti utilizzando il test Kruskal Wallis mostrano che i valori medi di TM, %DNA e TL (Tab. 7) di tutte le cellule contate nel gruppo di adulti esposti sono significativamente più elevati rispetto a quelli del gruppo controllo (TM: H=195,5, p<0,0001; %DNA: H=217,41 p<0,0001; TL: H=79,54, p<0,0001).

I risultati relativi ai gruppi trattati con la proteinasi K mostrano che l'azione della proteinasi K magnifica la differenza nelle risposte. I valori dei tre parametri misurati (Tab. 7) sono risultati significativamente maggiori negli animali esposti trattati con proteinasi K rispetto a quelli dei controlli trattati con proteinasi K (TM: H=27,29, p<0,0001; %DNA: H=43,13, p<0,0001; TL: H=4,59, p=0,032). Inoltre, i valori dei tre parametri analizzati (Tab. 7) sono significativamente

più elevati nel gruppo esposto, trattato con proteinasi K, rispetto a quelli relativi al gruppo esposto non trattato con proteinasi K (TM: $H=12,45$, $p=0,0004$; %DNA: $H=15,38$, $p=0,0001$; TL: $H=20,13$, $p<0,0001$).

Analizzando la percentuale di valori pari a zero (corrispondenti a nuclei interi, non danneggiati) rilevata nei differenti gruppi per tutti e tre i parametri utilizzati, si osserva un numero significativamente maggiore di valori di Tail Length pari a zero nel gruppo controllo rispetto al gruppo esposto ($\chi^2=4,31$, $p=0,038$). Non sono state riscontrate differenze significative fra la percentuale di valori uguali a zero presente nel gruppo controllo con e senza trattamento con proteinasi K per nessuno dei tre parametri (TM: $\chi^2=0,81$, $p=0,37$; %DNA: $\chi^2=2,30$, $p=0,13$; TL: $\chi^2=2,77$, $p=0,1$) né tra la percentuale di valori pari a zero presente nel gruppo esposto con e senza trattamento con proteinasi K (TM: $\chi^2=0,63$, $p=0,42$; %DNA: $\chi^2=0,00$, $p=1$; TL: $\chi^2=0,23$, $p=0,63$).

3.1.2 Cervello neonati.

I valori medi dei tre parametri, TM, %DNA e TL, per ogni individuo del gruppo controllo e del gruppo esposto sono illustrati in tabella 8 e rappresentati in grafici di dispersione. Si può vedere come i valori medi di Tail Moment per individuo (Fig. 18) del gruppo dei neonati esposti siano distribuiti prevalentemente nella parte alta del grafico rispetto a quelli del gruppo controllo.

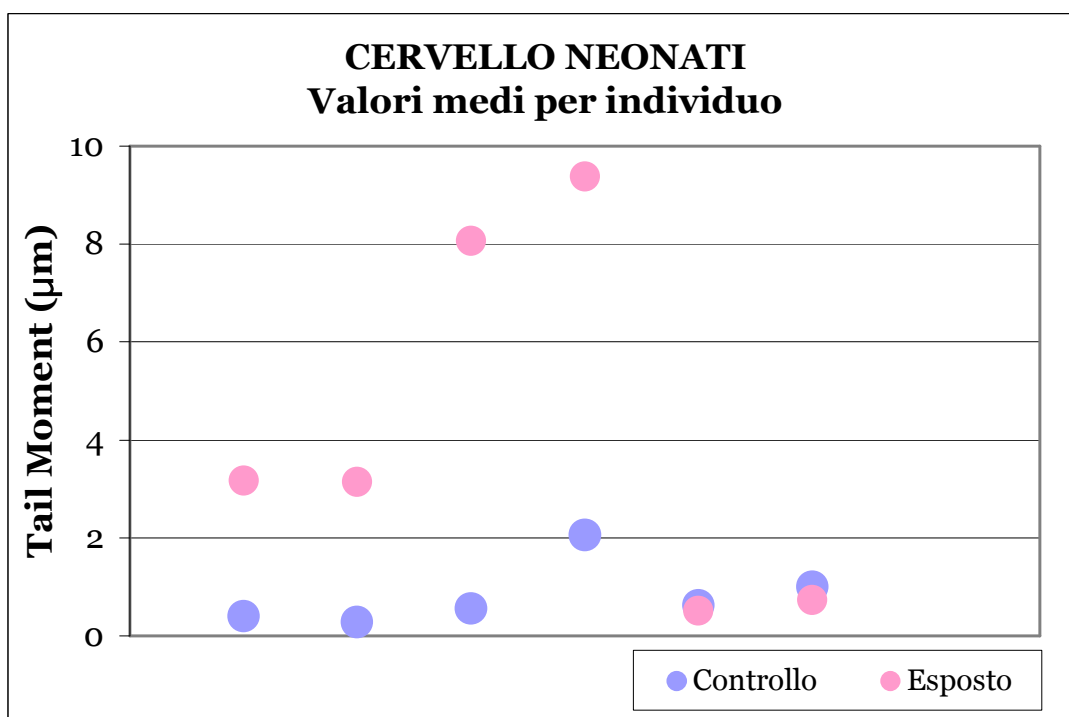


Fig. 18: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio di Tail Moment (μm) per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.
Fig. 18: Comet assay on brain cells from the new-born animals. Scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Moment (μm) per each individual of the control and exposed group.

La stessa tendenza si può osservare anche per i valori relativi alla percentuale di DNA nella coda e alla lunghezza della coda (Figg. 19, 20).

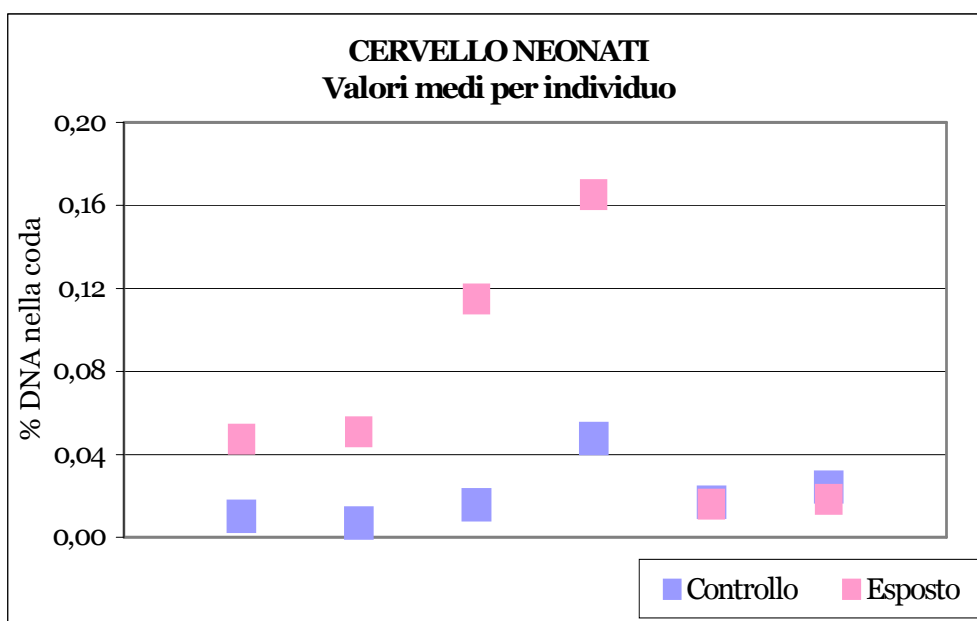


Fig. 19: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio della % di DNA nella coda per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.

Fig. 19: Comet assay on brain cells from the new-born animals. Scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of the % of DNA in the tail per each individual of the control and exposed group.

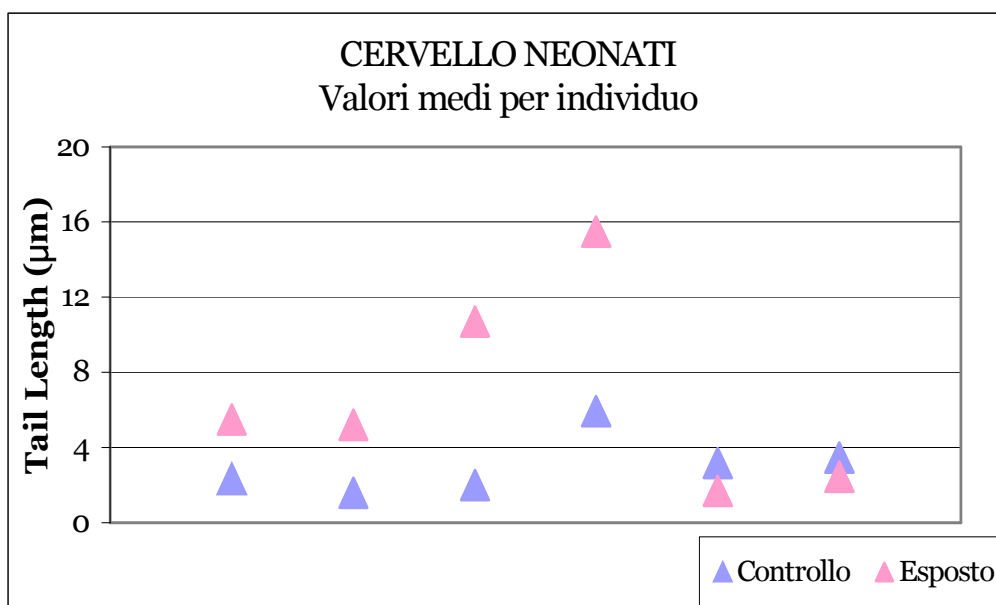


Fig. 20: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio di Tail Length (μm) per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.

Fig. 20: Comet assay on brain cells from the new-born animals. Scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Length (μm) per each individual of the control and exposed group.

CERVELLO NEONATI Medie per individuo

Tail Moment

	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401	100	0,40	0,04	1,08	0,11	0,00	7,80
C402	100	0,28	0,01	1,14	0,11	0,00	8,23
C404	100	0,56	0,08	1,63	0,16	0,00	11,63
C406	100	2,06	1,05	3,65	0,37	0,00	28,86
C502	100	0,63	0,14	1,10	0,11	0,00	5,91
C503	100	1,00	0,09	3,14	0,31	0,00	27,64

%DNA nella coda

	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401	100	0,01	0,01	0,02	0,002	0,00	0,14
C402	100	0,01	0,01	0,03	0,003	0,00	0,18
C404	100	0,02	0,01	0,03	0,003	0,00	0,24
C406	100	0,05	0,03	0,06	0,006	0,00	0,41
C502	100	0,02	0,01	0,03	0,003	0,00	0,15
C503	100	0,02	0,01	0,06	0,006	0,00	0,42

Tail Length

	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401	100	2,30	1,23	3,77	0,38	0,00	29,11
C402	100	1,57	0,82	3,68	0,37	0,00	27,06
C404	100	1,99	0,82	3,61	0,36	0,00	29,93
C406	100	5,93	5,13	4,35	0,44	0,00	27,06
C502	100	3,17	2,46	3,10	0,31	0,00	20,50
C503	100	3,45	2,05	5,75	0,58	0,00	41,41

Tail Moment

	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403	100	3,167	0,380	9,650	0,965	0,000	62,850
MA404	100	3,139	0,315	9,753	0,975	0,000	68,360
MA501	100	0,508	0,040	1,036	0,104	0,000	5,210
MA502	100	0,733	0,050	2,129	0,213	0,000	13,830
MA405	100	8,069	1,175	16,447	1,645	0,000	74,200
MA406	100	9,383	7,655	9,556	0,956	0,000	59,000

%DNA nella coda

	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403	100	0,05	0,01	0,12	0,01	0,00	0,79
MA404	100	0,05	0,01	0,13	0,01	0,00	0,68
MA501	100	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,13
MA502	100	0,02	0,00	0,05	0,00	0,00	0,26
MA405	100	0,11	0,03	0,19	0,02	0,00	0,82
MA406	100	0,17	0,15	0,14	0,01	0,00	0,74

Tail Length

	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403	100	5,48	2,67	9,32	0,93	0,00	56,58
MA404	100	5,20	2,87	8,90	0,89	0,00	53,30
MA501	100	1,69	0,82	2,64	0,26	0,00	17,22
MA502	100	2,43	0,82	5,01	0,50	0,00	36,08
MA405	100	10,71	4,31	13,47	1,35	0,00	57,81
MA406	100	15,49	14,97	9,77	0,98	0,41	46,74

CERVELLO NEONATI (con proteinasi K) Medie per individuo							
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401 K	100	1,57	0,73	2,28	0,23	0,00	14,34
C402 K	100	0,76	0,05	2,42	0,24	0,00	14,81
C404 k	100	0,62	0,04	2,42	0,24	0,00	17,83
C406 K	100	2,89	1,12	4,82	0,48	0,00	22,54
C502 K	100	0,88	0,21	2,67	0,27	0,00	24,13
C503 K	100	0,87	0,16	2,30	0,23	0,00	18,61
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401 K	100	0,04	0,02	0,04	0,004	0,00	0,19
C402 K	100	0,02	0,01	0,05	0,005	0,00	0,28
C404 k	100	0,01	0,01	0,04	0,004	0,00	0,32
C406 K	100	0,06	0,04	0,08	0,008	0,00	0,36
C502 K	100	0,02	0,01	0,04	0,004	0,00	0,36
C503 K	100	0,02	0,01	0,04	0,004	0,00	0,29
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401 K	100	6,60	5,54	5,50	0,55	0,00	31,16
C402 K	100	2,57	1,23	4,49	0,45	0,00	25,83
C404 k	100	2,00	0,82	5,61	0,56	0,00	50,84
C406 K	100	6,40	4,51	6,13	0,61	0,00	32,39
C502 K	100	3,93	2,46	5,13	0,51	0,00	31,57
C503 K	100	3,75	2,67	4,39	0,44	0,00	24,60
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403 K	100	1,20	0,61	1,79	0,18	0,00	11,04
MA404 K	100	2,22	0,47	6,90	0,69	0,00	49,52
MA501 K	100	0,47	0,17	0,62	0,06	0,00	2,75
MA502 K	100	1,10	0,09	4,24	0,42	0,00	38,00
MA405 K	100	4,76	0,71	10,48	1,05	0,00	46,63
MA406 K	100	8,32	6,51	5,43	0,54	0,00	27,51
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403 K	100	0,02	0,01	0,03	0,003	0,00	0,18
MA404 K	100	0,04	0,01	0,09	0,009	0,00	0,54
MA501 K	100	0,02	0,01	0,02	0,002	0,00	0,06
MA502 K	100	0,03	0,01	0,07	0,007	0,00	0,53
MA405 K	100	0,08	0,02	0,14	0,014	0,00	0,56
MA406 K	100	0,14	0,13	0,08	0,008	0,00	0,38
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403 K	100	4,33	3,28	4,10	0,41	0,00	19,27
MA404 K	100	4,93	2,87	7,71	0,77	0,00	57,81
MA501 K	100	3,97	1,64	9,12	0,91	0,00	53,71
MA502 K	100	3,06	1,03	7,12	0,71	0,00	40,59
MA405 K	100	6,51	2,87	9,02	0,90	0,00	38,54
MA406 K	100	13,47	12,51	6,06	0,61	0,00	29,11

Tab. 8: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Per ognuno dei tre parametri analizzati sono riportati, per ciascun individuo: sigla identificativa, numero di cellule contate (N) il valore medio (X) e la mediana del parametro, la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio, il valore minimo e massimo.

Tab. 8: Comet assay on brain cells from the new-born animals. For each analysed parameters the animal's code, the number of counted cells per animal (N), the mean (X) and median values, the standard deviation (SD) and the standard error (SE) of means, the minimum and maximum value for each animal involved in the experiment are shown.

I confronti dei valori medi dei tre parametri analizzati nei quattro gruppi (Tab. 9) confermano sostanzialmente la tendenza osservata nei diagrammi di dispersione.

CERVELLO NEONATI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	6	0,82	0,65	0,27	0,28	2,06
Esposto	6	4,17 ^a	3,73	1,52	0,51	9,38
Controllo K	6	1,27	0,86	0,35	0,62	2,89
Esposto K	6	3,01	3,01	1,23	0,47	8,32
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	6	0,02	0,01	0,01	0,01	0,05
Esposto	6	0,07 ^a	0,06	0,02	0,02	0,17
Controllo K	6	0,03	0,02	0,01	0,01	0,06
Esposto K	6	0,05	0,05	0,02	0,02	0,14
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	6	3,07	1,57	0,64	1,57	5,93
Esposto	6	6,83	5,30	2,16	1,69	15,49
Controllo K	6	4,21	1,91	0,78	2,00	6,60
Esposto K	6	6,04	3,82	1,56	3,06	13,47

Tab. 9: Comet assay sul cervello degli animali neonati. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length), il numero di individui per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per i quattro gruppi considerati.

$\alpha = p < 0,05$

TM, %DNA: Esposto > Controllo

Tab. 9: Comet assay on brain cells from the new-born animals. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA in the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of individual per group (N), the mean value (X), standard deviations (SD) and standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

$\alpha = p < 0,05$

TM, %DNA: Exposed (Esposto) > Control (Controllo)

Il valore medio di Tail Moment e della percentuale di DNA nella coda (Fig. 21, 22 e Tab. 9) è risultato infatti significativamente più elevato nel gruppo esposto che nel gruppo controllo (rispettivamente $t=2,38$, $p=0,039$ e $t=2,27$, $p=0,046$).

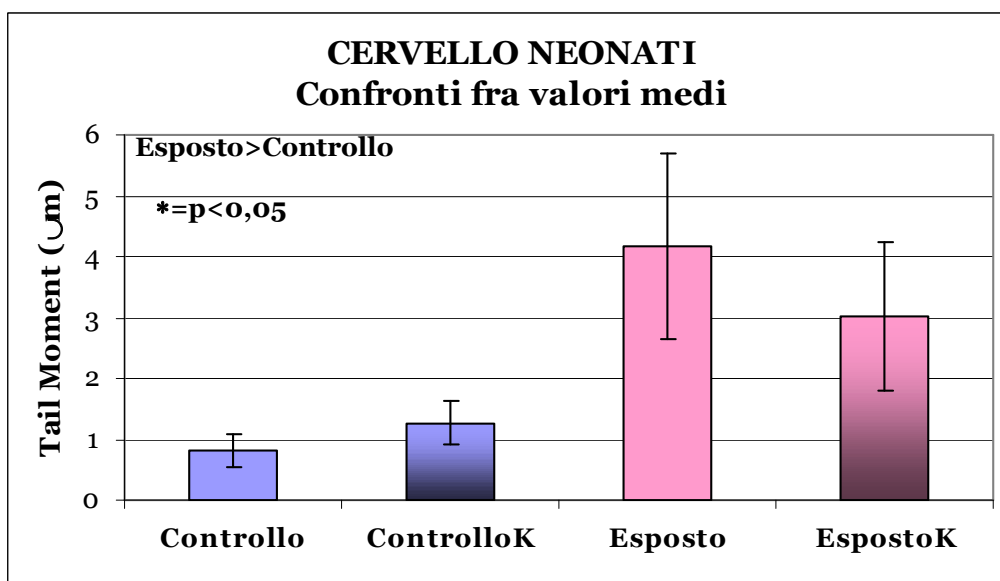


Fig. 21: *Comet assay* sul cervello degli animali neonati. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi di Tail Moment (μm) per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

*= $p < 0,05$ Esposto > Controllo.

Fig. 21: *Comet assay on brain cells from the new-born animals. Comparison between the mean values of Tail Moment (μm) of each of the four analysed groups.*

*= $p = 0,05$ Exposed (Esposto) > Control (Controllo)

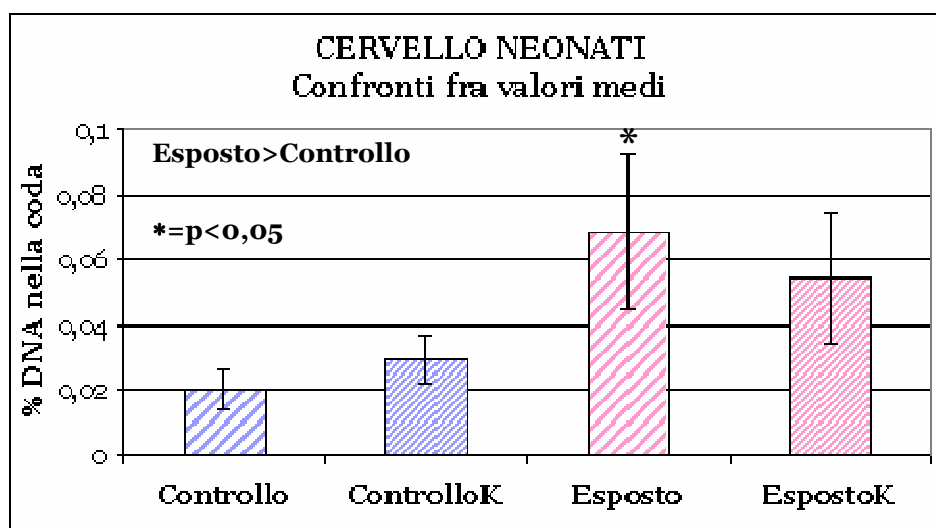


Fig. 22: *Comet assay* sul cervello degli animali neonati. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi della % di DNA nella coda per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

*= $p < 0,05$ Esposto > Controllo

Fig. 22: *Comet assay on brain cells from the new-born animals. Comparison between the mean values of the % of DNA in the tail of each of the four analysed groups.*

*= $p = 0,05$ Exposed (Esposto) > Control (Controllo)

Nessuna differenza significativa è emersa dal confronto dei valori di TM, %DNA e TL del gruppo controllo e di quello controllo trattato con proteinasi K (TM: $t=1,35$, $p=0,21$; %DNA: $t=1,17$, $p=0,26$; TL: $t=1,17$, $p=0,27$).

Nei grafici delle distribuzioni dei valori ottenuti per le singole cellule ($N = 600$) si osserva che i valori di TM (Fig. 23), %DNA (Fig. 24) e TL (Fig. 25) relativi al gruppo dei neonati esposti sono distribuiti su un range più ampio rispetto a quelli del gruppo controllo. Nel gruppo degli esposti sono infatti presenti alcune cellule con valori dei tre parametri decisamente più elevati, ciò indica che queste cellule hanno subito un danno al DNA in misura maggiore rispetto alle altre.

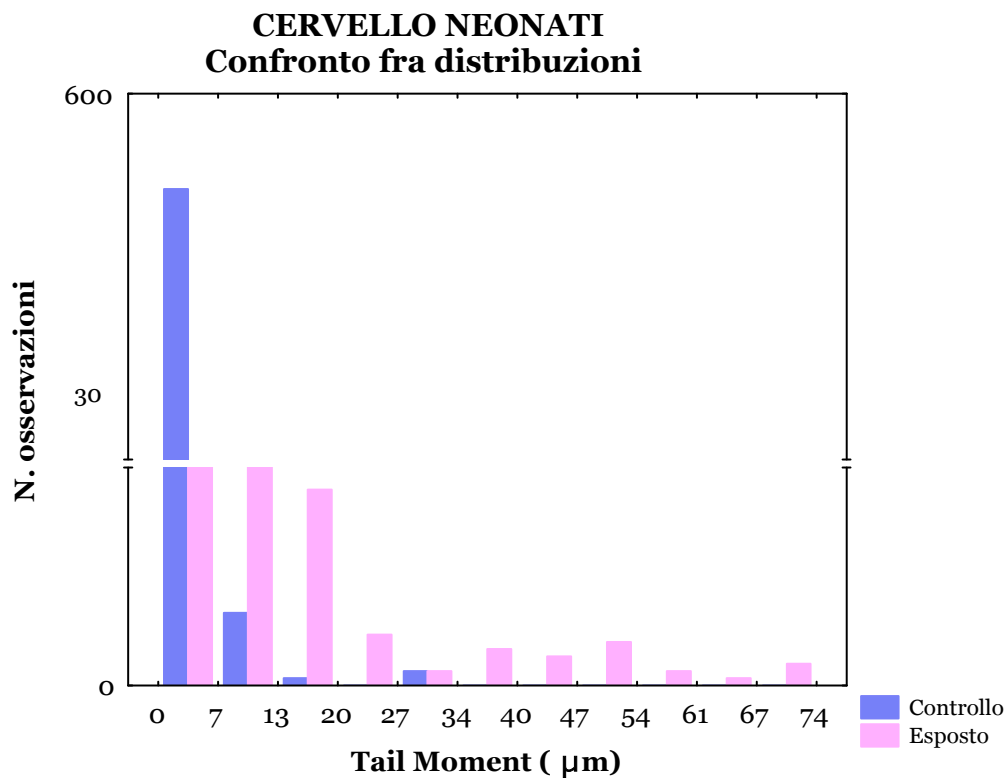


Fig. 23: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Moment riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Moment in μm .

Fig. 23: Comet assay on brain cells from the new-born animals. Comparison of frequency distribution of Tail Moment of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Moment values, in μm , are reported on the x axis.

CERVELLO NEONATI Confronto fra distribuzioni

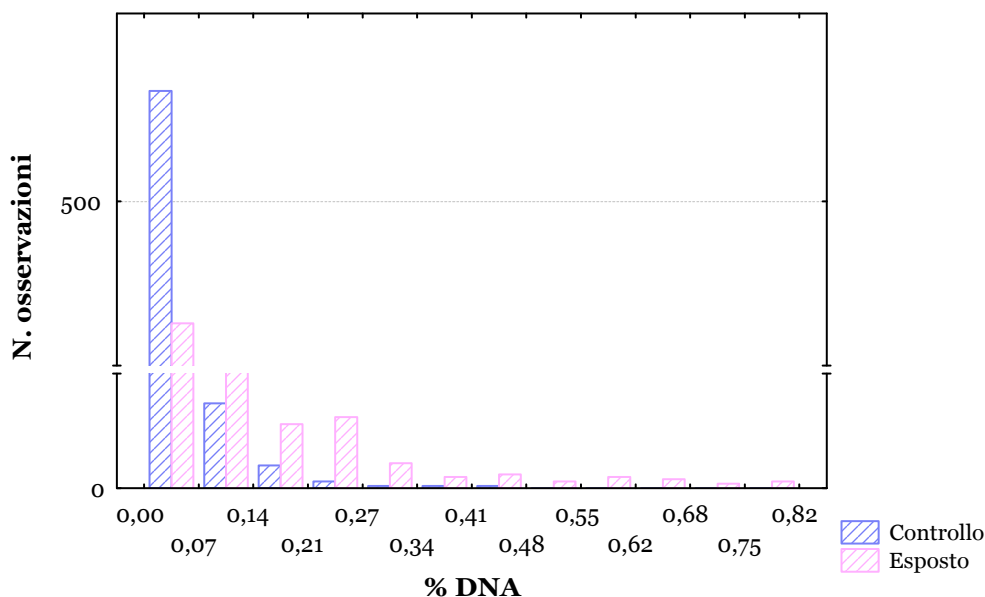


Fig. 24: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori della % di DNA nella coda riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore della % di DNA nella coda.

Fig. 24: Comet assay on brain cells from the new-born animals. Comparison of frequency distribution of the % of DNA in the tail of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the % of DNA in the tail values are reported on the x axis.

CERVELLO NEONATI Confronti fra distribuzioni

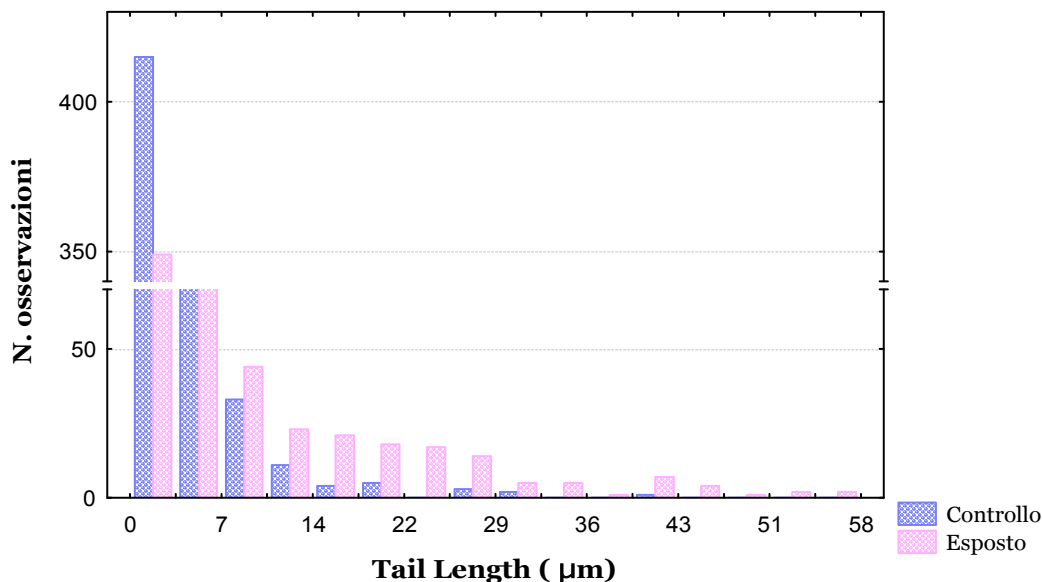


Fig. 25: Comet assay sul cervello degli animali neonati. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Length riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Length in µm.

Fig. 25: Comet assay on brain cells from the new-born animals. Comparison of frequency distribution of the Tail Length of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Length values, in µm, are reported on the x axis.

La tendenza che si evince da una analisi visiva dei grafici di distribuzione viene confermata dal confronto statistico dei valori medi dei tre parametri come mostrato nella tabella 10 effettuato applicando il test di Kruskal Wallis.

CERVELLO NEONATI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	600	0,82	2,29	0,09	0	28,86
Esposto	600	4,17 ^b	10,17	0,42	0	74,20
Controllo K	600	1,27 ^b	3,05	0,12	0	24,13
Esposto K	600	3,01 ^b	6,48	0,26	0	49,52
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	600	0,02	0,04	0,002	0	0,42
Esposto	600	0,07 ^b	0,13	0,005	0	0,82
Controllo K	600	0,03 ^b	0,05	0,002	0	0,36
Esposto K	600	0,05 ^b	0,09	0,004	0	0,56
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	600	3,07	4,36	0,18	0	41,41
Esposto	600	6,83 ^b	10,10	0,41	0	57,81
Controllo K	600	4,21 ^b	5,51	0,22	0	50,84
Esposto K	600	6,04 ^a	8,15	0,33	0	57,81

Tab. 10: Comet assay sul cervello dei topi neonati. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length) il numero di cellule contate per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per le cellule dei quattro gruppi considerati.

a=p<0,01 b=p<0,001

TM, %DNA, TL: Esposto>Controllo

TM, %DNA, TL: EspostoK>ControlloK

TM, %DNA, TL: ControlloK>Controllo

Tab. 10: Comet assay on brain cell from the new-born mice. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA of the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of counted cells per groups (N), the mean value (X), standard deviation (SD), standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

a=p<0,01 b=p<0,001

TM, %DNA, TL: Exposed (Esposto)>Control (Controllo)

TM, %DNA, TL: ExposedK (EspostoK)>ControlK (ControlloK)

TM, %DNA, TL: ControlK (ControlloK)>Control (Controllo)

I valori medi di tutti e tre i parametri risultano, infatti, significativamente più elevati nel gruppo esposto che in quello controllo (TM: H=51,26, p<0,0001; %DNA: H=28,52, p<0,0001; TL: H=51, p<0,0001). Anche nei due gruppi trattati con proteinasi K i valori medi di tutti e tre i parametri utilizzati relativi al gruppo dei neonati esposti risultano statisticamente più elevati

rispetto a quelli del gruppo controllo (TM: $H=35,322$, $p<0,0001$; %DNA: $H=26,708$, $p<0,0001$; TL: $H=9,099$, $p=0,003$). Dal confronto fra i valori medi di tutti e tre i parametri emerge che nel gruppo controllo trattato con proteinasi K tutti e tre i parametri sono significativamente più elevati di quelli del gruppo controllo non trattato (TM: $H=16,923$, $p<0,0001$; %DNA: $H=14,889$, $p=0,0001$; TL: $H=20,23$, $p<0,0001$).

Nel gruppo di topi controllo è, inoltre, presente una percentuale di cellule con valore di Tail Moment e di percentuale di DNA pari a zero significativamente più elevata rispetto a quella presente nel gruppo esposto (TM: $\chi^2=8,05$, $p=0,004$; %DNA: $\chi^2=21,97$, $p<0,0001$) e rispetto a quella presente nel gruppo controllo trattato con proteinasi K per tutti e tre i parametri (TM: $\chi^2=7,25$, $p=0,07$; %DNA: $\chi^2=13,25$, $p=0,0003$; TL: $\chi^2=5,41$, $p=0,02$). Infine un numero significativamente più elevato di cellule con valore di TM e %DNA nella coda pari a zero è presente nel gruppo controllo trattato con proteinasi K rispetto a quello presente nel gruppo esposto trattato con proteinasi K (TM: $\chi^2=8,38$, $p=0,004$; %DNA: $\chi^2=55,81$, $p<0,0001$).

3.1.3 Incremento proporzionale

Confrontando i risultati ottenuti negli adulti con quelli dei neonati si osserva che l'incremento proporzionale dei valori medi di tutti e tre i parametri presi in considerazione, espresso come il rapporto, in valore assoluto, fra il valore medio del parametro considerato per il gruppo esposto e quello per il gruppo controllo, è sempre più elevato nei neonati che negli adulti (Tab. 11, Figg. 26, 27, 28).

CERVELLO		
	ADULTI	NEONATI
TM	2,06	5,08
%DNA nella coda	1,76	2,6
TL	1,32	2,22

Tab. 11: In tabella sono riportati i rapporti esposto/controllo dei tre parametri misurati nel cervello di adulti e neonati.

Tab. 11: Table shows the values of the exposed/control ratio of the three parameters measured in brain from adults and new-borns.

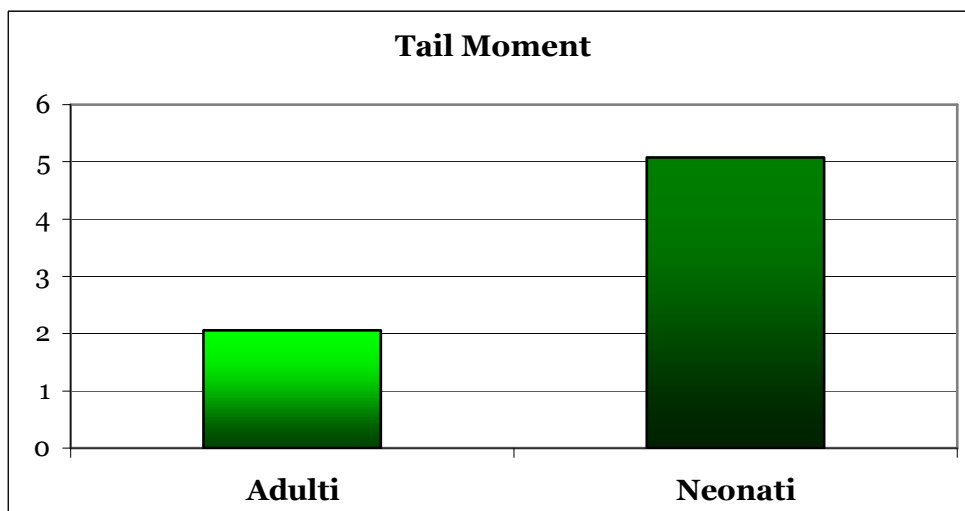


Fig. 26: Confronto della risposta ottenuta con il *Comet assay* nel cervello dei topi adulti e neonati. Gli istogrammi rappresentano l'incremento della risposta ottenuta calcolato come rapporto fra il valore medio del Tail Moment del gruppo esposto e del gruppo controllo (TM esposto/TM controllo) in valore assoluto.

Fig. 26: Comparison between the response of adult and new-born mice measured with the comet assay on brain cells. The histogram represent the increment of the response obtained as the ratio between the mean value of Tail Moment of the exposed group and the control one (TM exposed/TM control) expressed in absolute value.

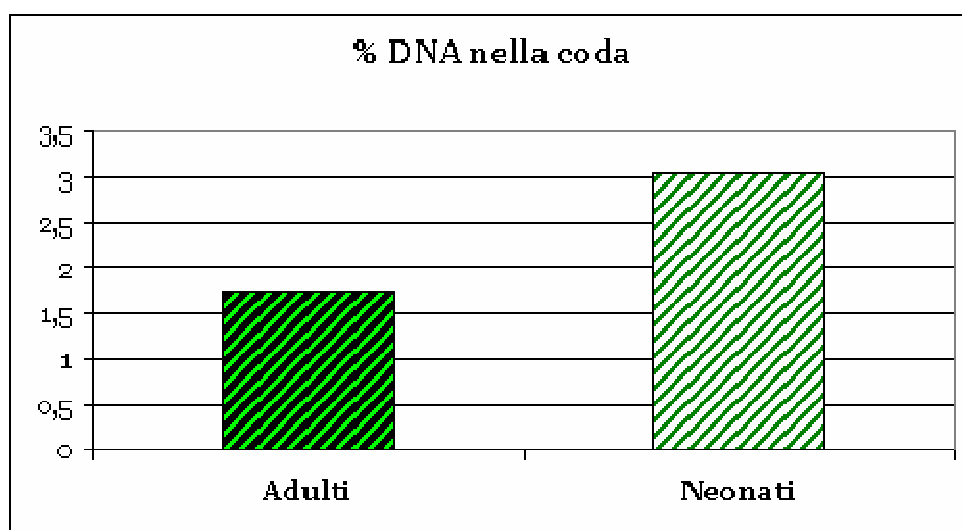


Fig. 27: Confronto della risposta ottenuta con il *Comet assay* nel cervello dei topi adulti e neonati. Gli istogrammi rappresentano l'incremento della risposta ottenuta calcolato come rapporto fra il valore medio della % di DNA nella coda del gruppo esposto e del gruppo controllo (%DNA esposto/%DNA controllo) in valore assoluto.

Fig. 27: Comparison between the response of adult and new-born mice measured with the comet assay on brain cells. The histogram represent the increment of the response obtained as the ratio between the mean value of the % of DNA in the tail of the exposed group and the control one (%DNA exposed/%DNA control) expressed in absolute value.

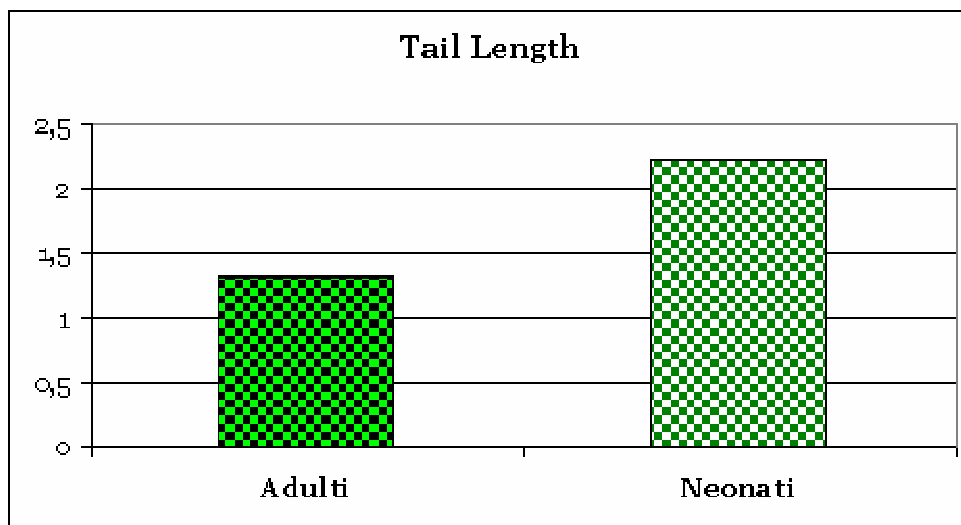


Fig. 28: Confronto della risposta ottenuta con il *Comet assay* nel cervello degli animali adulti e neonati. Gli istogrammi rappresentano l'incremento della risposta ottenuta calcolato come rapporto fra il valore medio di Tail Length del gruppo esposto e del gruppo controllo (TL esposto/TL controllo) in valore assoluto.

Fig. 28: Comparison between the response of adult and new-born mice measured with the comet assay on brain cells. The histogram represent the increment of the response obtained as the ratio between the mean value of Tail Length of the exposed group and the control one (TL exposed/TL control) expressed in absolute value.

In particolare questo incremento, nel Tail Moment, ha un valore pari a 5,08 mentre negli adulti questo stesso valore è 2,06. Il valore del rapporto della percentuale di DNA nella coda è pari a 2,6 nei neonati mentre è di 1,75 negli adulti. Anche il valore del rapporto del Tail Length è più elevato negli animali neonati (2,22) che in quelli adulti (1,32).

3.2 Sangue

3.2.1 Sangue Adulti.

I valori medi di TM, %DNA e TL misurati nel sangue per ogni singolo individuo, del gruppo controllo ed esposto, sono riportati in tabella 12 e mostrati nei grafici di dispersione (Figg. 29, 30, 31).

Si nota che, a differenza di quanto osservato nei grafici di dispersione dei dati relativi al cervello, i valori medi per individuo di TM, %DNA nella coda e TL del gruppo esposto tendono a sovrapporsi a quelli del gruppo controllo.

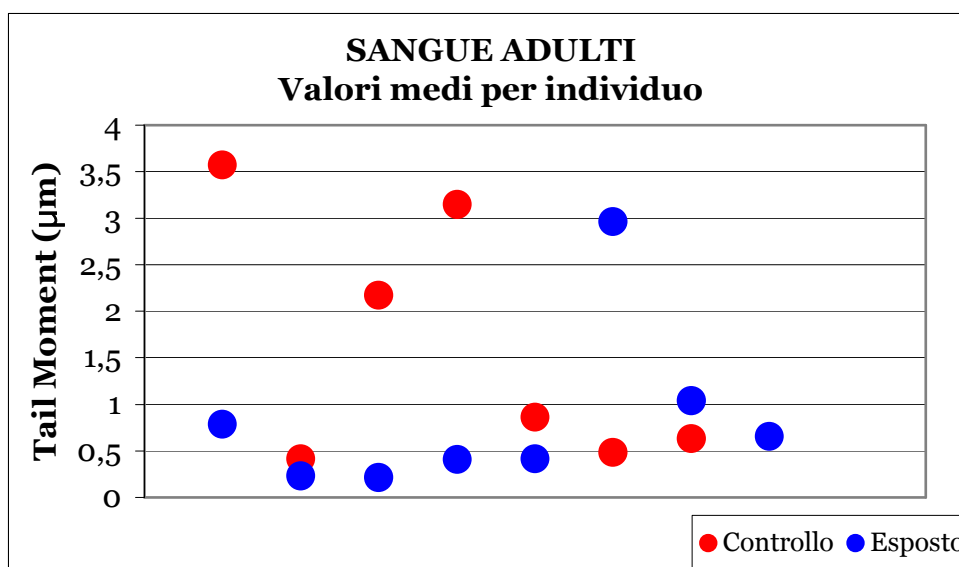


Fig. 29: Comet assay sul sangue degli animali adulti: grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio di Tail Moment (μm) per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.

Fig. 29: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals: scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Moment (μm) per each individual of the control and exposed group.

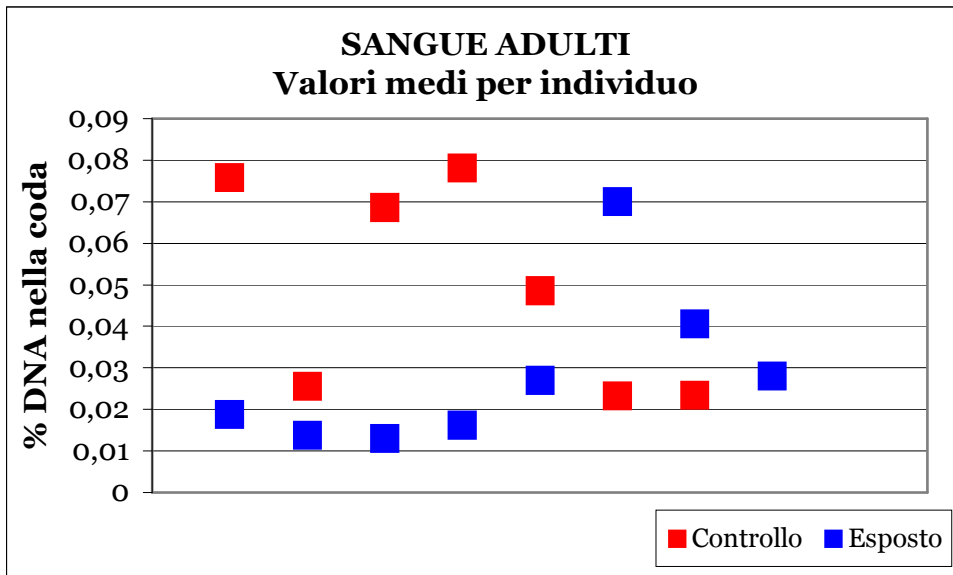


Fig. 30: Comet assay sul sangue degli animali adulti: grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio della % di DNA nella coda per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.

Fig. 30: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals: scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of the % of DNA in the tail per each individual of the control and exposed group.

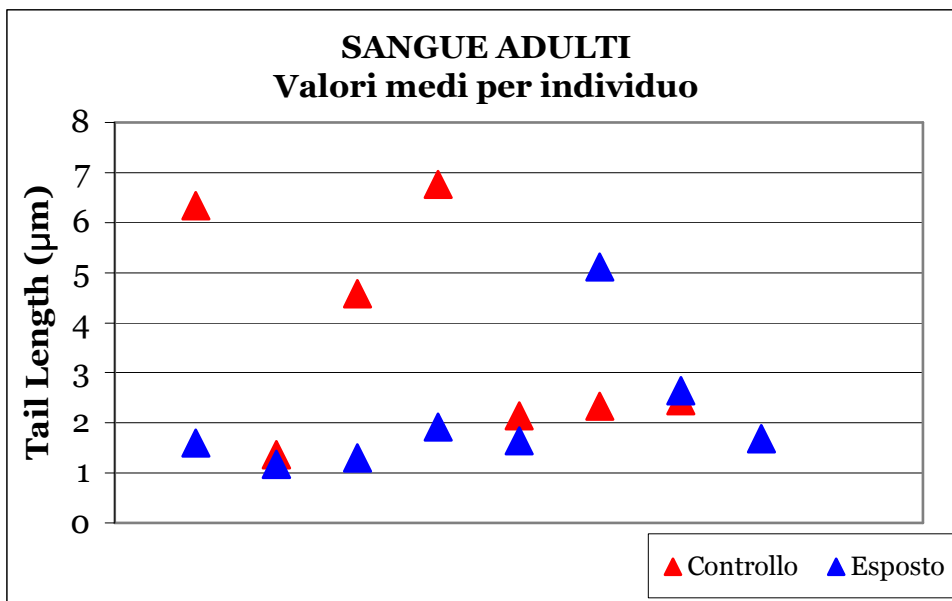


Fig. 31: Comet assay sul sangue degli animali adulti: grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio di Tail Length (µm) per ogni individuo del gruppo controllo ed esposto.

Fig. 31: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals: scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Length (µm) per each individual of the control and exposed group.

SANGUE ADULTI Medie per individuo							
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1	100	3,57	0,60	7,12	0,71	0,00	32,03
AD2	100	0,41	0,19	0,63	0,06	0,00	3,79
AD3	100	2,17	0,70	4,76	0,48	0,00	36,15
AD4	100	3,15	0,90	6,84	0,68	0,00	46,30
AD5	100	0,86	0,55	0,98	0,10	0,00	6,62
AD6	100	0,48	0,26	0,73	0,07	0,00	4,39
AD7	100	0,63	0,19	1,19	0,12	0,00	6,99
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1	100	0,08	0,03	0,11	0,011	0,00	0,43
AD2	100	0,03	0,02	0,02	0,002	0,00	0,09
AD3	100	0,07	0,05	0,07	0,007	0,00	0,44
AD4	100	0,08	0,05	0,10	0,010	0,00	0,57
AD5	100	0,05	0,04	0,03	0,003	0,00	0,17
AD6	100	0,02	0,02	0,02	0,002	0,00	0,13
AD7	100	0,02	0,01	0,03	0,003	0,00	0,18
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1	100	6,34	2,46	9,34	0,93	0,00	41,41
AD2	100	1,37	0,82	1,56	0,16	0,00	5,74
AD3	100	4,58	2,46	7,03	0,70	0,00	36,49
AD4	100	6,76	3,69	9,62	0,96	0,00	57,40
AD5	100	2,14	2,05	1,82	0,18	0,00	11,07
AD6	100	2,33	2,05	1,97	0,20	0,00	10,25
AD7	100	2,44	1,64	3,23	0,32	0,00	18,86
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1	100	0,78	0,01	4,48	0,45	0,00	42,12
ADM2	100	0,23	0,04	0,43	0,04	0,00	3,06
ADM3	100	0,21	0,09	0,35	0,04	0,00	2,07
ADM4	100	0,41	0,20	0,58	0,06	0,00	3,45
ADM5	100	0,41	0,20	0,60	0,06	0,00	3,74
ADM6	100	2,96	0,62	8,56	0,86	0,00	50,79
ADM7	100	1,04	0,46	1,57	0,16	0,00	8,46
ADM8	100	0,65	0,12	1,23	0,12	0,00	7,10
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1	100	0,02	0,01	0,06	0,006	0,00	0,54
ADM2	100	0,01	0,01	0,02	0,002	0,00	0,08
ADM3	100	0,01	0,01	0,02	0,002	0,00	0,08
ADM4	100	0,02	0,01	0,02	0,002	0,00	0,16
ADM5	100	0,03	0,02	0,03	0,003	0,00	0,12
ADM6	100	0,07	0,04	0,12	0,012	0,00	0,61
ADM7	100	0,04	0,02	0,05	0,005	0,00	0,27
ADM8	100	0,03	0,01	0,05	0,005	0,00	0,25
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1	100	1,60	0,82	4,45	0,44	0,00	33,21
ADM2	100	1,17	0,82	1,52	0,15	0,00	8,20
ADM3	100	1,30	1,03	1,56	0,16	0,00	7,79
ADM4	100	1,92	1,64	1,86	0,19	0,00	8,61
ADM5	100	1,64	1,64	1,51	0,15	0,00	7,38
ADM6	100	5,12	2,46	9,27	0,93	0,00	50,84
ADM7	100	2,64	1,85	2,71	0,27	0,00	14,76
ADM8	100	1,68	1,23	1,94	0,19	0,00	9,43

SANGUE ADULTI (con proteinasi K) Medie per individuo							
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1 K	100	1,58	0,91	2,35	0,23	0,00	17,35
AD2 K	100	1,96	0,25	9,33	0,93	0,00	87,05
AD3 K	100	0,94	0,23	1,81	0,18	0,00	8,85
AD4 K	100	0,75	0,34	1,15	0,12	0,00	7,14
AD5 K	100	2,37	0,84	5,81	0,58	0,00	47,89
AD6 K	100	0,94	0,33	1,80	0,18	0,00	12,60
%DNA nella coda							
	N	Media	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1 K	100	0,04	0,03	0,04	0,004	0,00	0,28
AD2 K	100	0,04	0,01	0,10	0,010	0,00	0,88
AD3 K	100	0,04	0,02	0,04	0,004	0,00	0,20
AD4 K	100	0,03	0,01	0,03	0,003	0,00	0,18
AD5 K	100	0,05	0,03	0,08	0,008	0,00	0,55
AD6 K	100	0,02	0,01	0,03	0,003	0,00	0,20
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
AD1 K	100	5,752	4,510	5,940	0,594	0,000	37,310
AD2 K	100	4,633	2,870	8,129	0,813	0,000	68,880
AD3 K	100	2,768	1,845	3,331	0,333	0,000	17,220
AD4 K	100	3,063	2,665	2,589	0,259	0,000	12,710
AD5 K	100	6,351	4,100	7,459	0,746	0,000	47,560
AD6 K	100	4,457	3,280	5,553	0,555	0,000	30,750
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1 K	100	0,40	0,11	0,68	0,07	0,00	3,56
ADM2 K	100	0,41	0,12	0,83	0,08	0,00	5,34
ADM3 K	100	0,31	0,03	0,77	0,08	0,00	6,26
ADM4 K	100	0,47	0,23	0,67	0,07	0,00	3,17
ADM5 K	100	1,71	1,19	1,61	0,16	0,00	8,83
ADM6 K	100	0,55	0,29	0,71	0,07	0,00	3,42
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1 K	100	0,02	0,01	0,02	0,002	0,00	0,11
ADM2 K	100	0,02	0,01	0,02	0,002	0,00	0,12
ADM3 K	100	0,01	0,00	0,02	0,002	0,00	0,14
ADM4 K	100	0,02	0,01	0,02	0,002	0,00	0,07
ADM5 K	100	0,05	0,05	0,04	0,004	0,00	0,19
ADM6 K	100	0,02	0,02	0,02	0,002	0,00	0,13
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
ADM1 K	100	1,74	1,23	1,83	0,18	0,00	8,20
ADM2 K	100	1,91	0,82	2,42	0,24	0,00	11,89
ADM3 K	100	1,33	0,82	2,12	0,21	0,00	14,35
ADM4 K	100	2,55	2,05	2,40	0,24	0,00	12,30
ADM5 K	100	5,57	4,92	3,79	0,38	0,00	20,09
ADM6 K	100	2,52	2,05	2,39	0,24	0,00	9,43

Tab. 12: Comet assay sul sangue degli animali adulti. Per ognuno dei tre parametri analizzati sono riportati, per ciascun individuo: sigla identificativa, numero di cellule contate (N) il valore medio (X) e la mediana del parametro, la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio, il valore minimo e massimo.

Tab. 12: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. For each analysed parameters the animal's code, the number of counted cells per animal (N), the mean (X) and median values, the standard deviation (SD) and the standard error (SE) of means, the minimum and maximum value for each animal involved in the experiment are shown.

I valori medi di TM, %DNA e TL dei gruppi esposti e di quelli controllo (con e senza proteinasi K) (Tab. 13) non mostrano tra loro differenze statisticamente significative (TM: $t=1,49$, $p=0,16$; %DNA: $t=1,93$, $p=0,075$; TL: $t=1,83$, $p=0,09$).

SANGUE ADULTI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	7	1,61	1,34	0,51	0,41	3,57
Esposto	8	0,84	0,90	0,32	0,21	2,96
Controllo K	6	1,42 ^a	0,65	0,27	0,75	2,37
Esposto K	6	0,64	0,53	0,22	0,31	1,71
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	7	0,05	0,03	0,01	0,02	0,08
Esposto	8	0,03	0,02	0,01	0,01	0,07
Controllo K	6	0,04	0,01	0,004	0,02	0,05
Esposto K	6	0,02	0,02	0,01	0,01	0,05
Tail length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	7	3,71	2,18	0,82	1,37	6,76
Esposto	8	2,13	1,28	0,45	1,17	5,12
Controllo K	6	4,50 ^a	1,42	0,58	2,77	6,35
Esposto K	6	2,60	1,53	0,62	1,33	5,57

Tab. 13: Comet assay sul sangue degli animali adulti. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length) il numero di individui per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per i quattro gruppi considerati.

$a=p<0,05$,

TM, TL: ControlloK>EspostoK

Tab. 13: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA in the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of individual per group (N), the mean value (X), standard deviations (SD) and standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

$a=p<0,05$

TM, TL: ControlK (ControlloK)>ExposedK (EspostoK)

Nel gruppo controllo trattato con proteinasi K i valori medi dei parametri di TM e TL (Tab. 13 e Figg. 32, 33) sono significativamente più elevati rispetto a quelli del gruppo esposto trattato con proteinasi K (TM: $t=2,878$, $p=0,016$; TL: $t=2,5413$, $p=0,029$). Nessuna differenza significativa è stata osservata, per nessuno dei tre parametri analizzati, tra il gruppo controllo trattato con proteinasi K e il gruppo controllo non trattato con proteinasi K (TM: $t=0,30$, $p=0,77$; %DNA: $t=0,87$, $p=0,40$; TL: $t=1,09$, $p=0,29$).

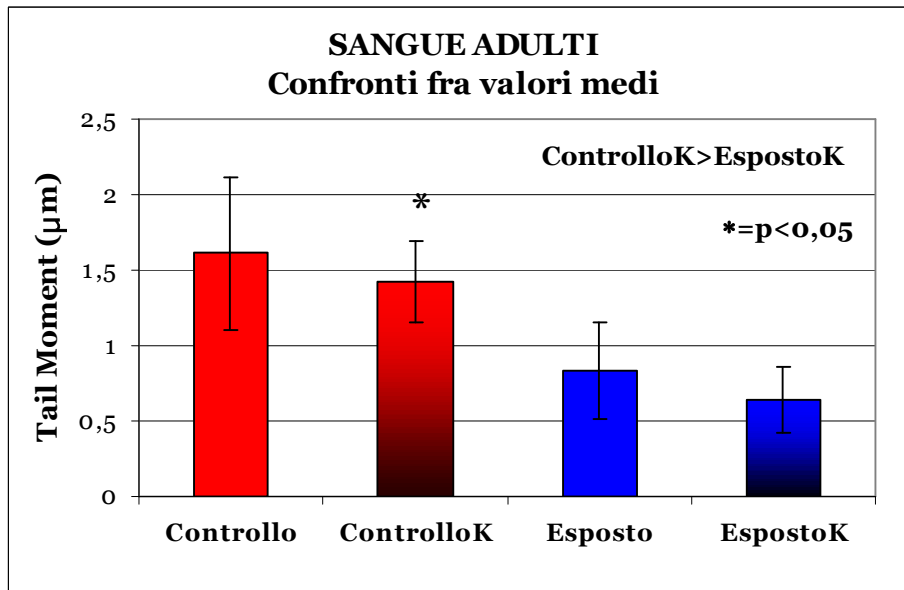


Fig. 32: Comet assay sul sangue degli animali adulti. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi di Tail Moment (μm) per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

*= $p < 0,05$ ControlloK > EspostoK

Fig. 32: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. Comparison between the mean values of Tail Moment (μm) of each of the four analysed groups.

*= $p < 0,05$ ControlK (ControlloK) > ExposedK (EspostoK)

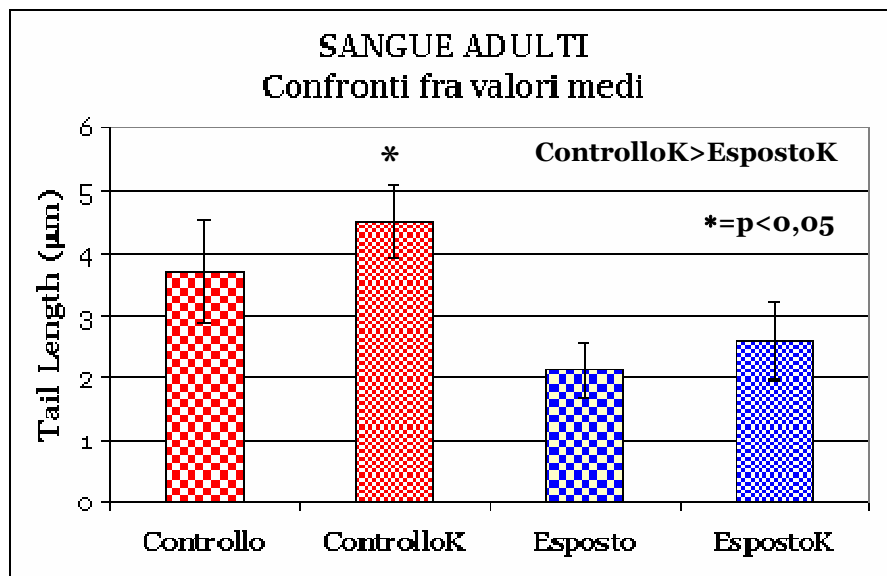


Fig. 33: Comet assay sul sangue degli animali adulti. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi di Tail Length (μm) per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

*= $p < 0,05$ ControlloK > EspostoK

Fig. 33: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. Comparison between the mean values of Tail Length (μm) of each of the four analysed groups.

*= $p < 0,05$ ControlK (ControlloK) > ExposedK (EspostoK)

Per ogni parametro (Figg. 34, 35, 36) sono state rappresentate le distribuzioni dei valori di tutte le cellule analizzate negli animali esposti (N = 800) ed in quelli controllo (N = 700).

Nel gruppo degli animali esposti è presente un maggior numero di cellule con valori bassi dei tre parametri. Comunque i valori registrati si mantengono generalmente bassi anche nel gruppo controllo.

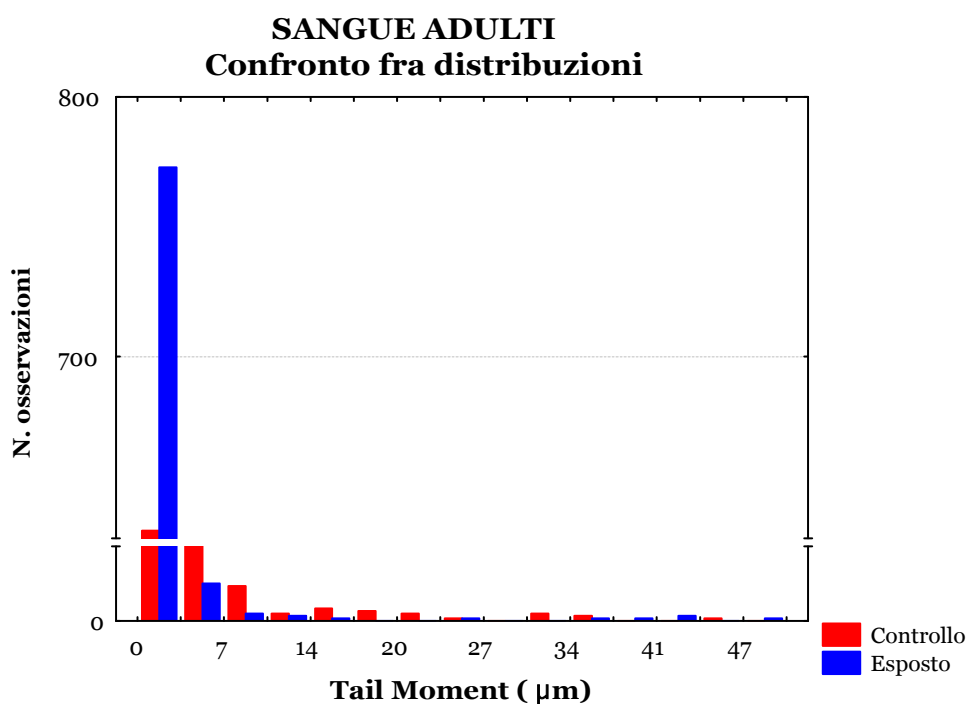


Fig. 34: Comet assay sul sangue degli animali adulti. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Moment riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Moment in μm .

Fig. 34: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. Comparison of frequency distribution of Tail Moment of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Moment values, in μm , are reported on the x axis.

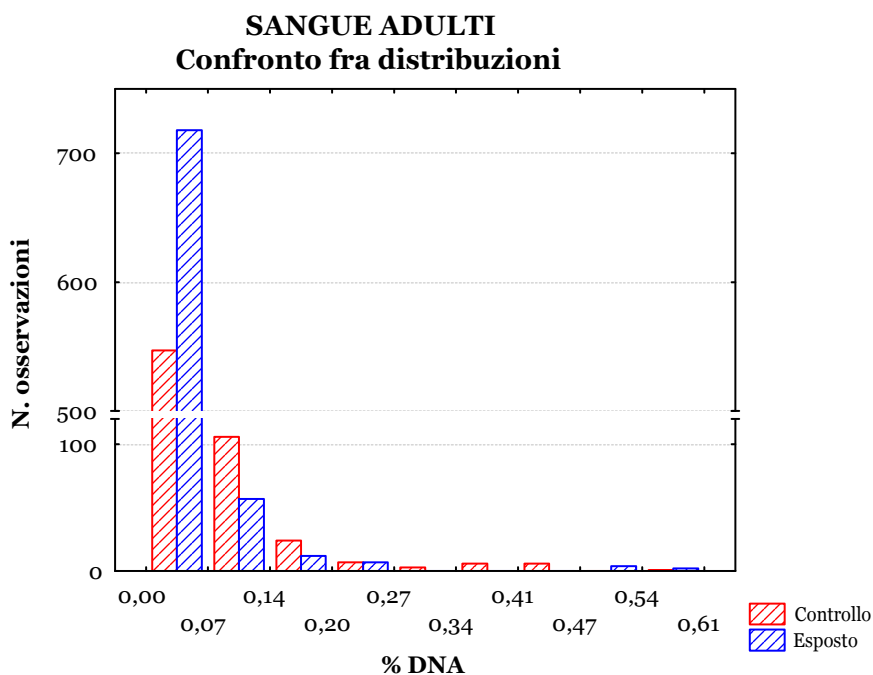


Fig. 35: Comet assay sul sangue degli animali adulti. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori della % di DNA nella coda riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore della % di DNA nella coda.

Fig. 35: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. Comparison of frequency distribution of the % of DNA in the tail of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the % of DNA in the tail values, are reported on the x axis.

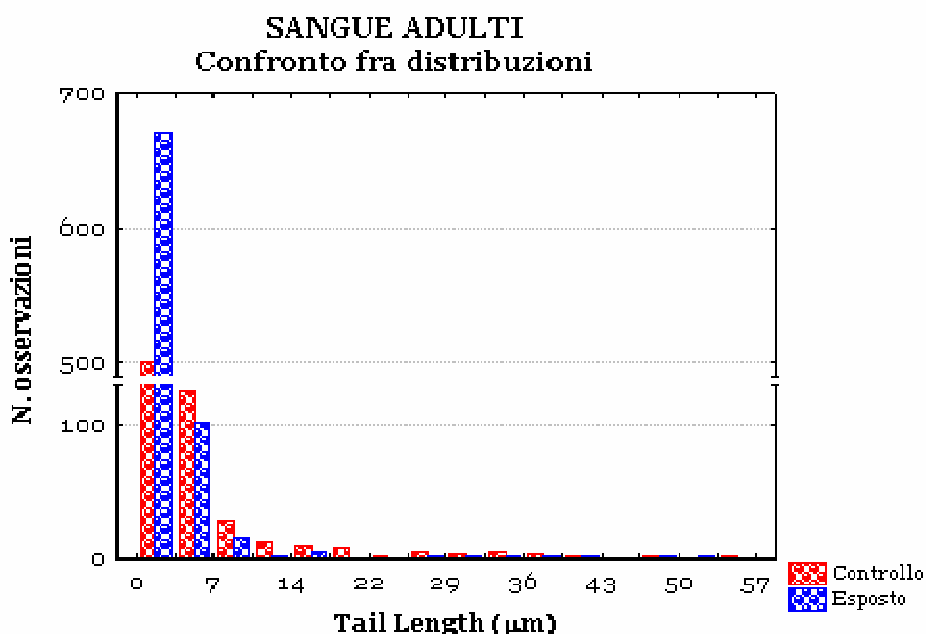


Fig. 36: Comet assay sul sangue degli animali adulti. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Length riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Length in µm.

Fig. 36: Comet assay on peripheral blood cells from the adult animals. Comparison of frequency distribution of Tail Length of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Length values, in µm, are reported on the x axis.

Le differenze tra i valori medi di TM, % di DNA e TL (Tab. 14) misurati nelle cellule del sangue dei topi adulti per ogni gruppo, sono state analizzate con il test Kruskal Wallis.

SANGUE ADULTI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	700	1,61 ^b	4,36	0,16	0	46,30
Esposto	800	0,84 ^a	3,59	0,13	0	50,79
Controllo K	600	1,42 ^b	4,75	0,19	0	87,05
Esposto K	600	0,64	1,05	0,04	0	8,83
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	700	0,05 ^b	0,07	0,003	0	0,57
Esposto	800	0,03	0,06	0,002	0	0,61
Controllo K	600	0,04 ^b	0,06	0,003	0	0,88
Esposto K	600	0,02	0,03	0,001	0	0,19
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	700	3,71 ^b	6,28	0,24	0	57,40
Esposto	800	2,13	4,15	0,15	0	50,84
Controllo K	600	4,50 ^b	5,97	0,24	0	68,88
Esposto K	600	2,60 ^b	2,91	0,12	0	20,09

Tab. 14: Comet assay sul sangue dei topi adulti. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length) il numero di cellule contate per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per le cellule dei quattro gruppi considerati.

a=p<0,01 b=p<0,001

TM, %DNA, TL: Controllo>Esposto

TL: EspostoK>Esposto

TM: Esposto>EspostoK

%DNA: Controllo>ControlloK

TL: ControlloK>Controllo

TM, %DNA, TL: ControlloK>EspostoK

Tab. 14: Comet assay on peripheral blood cell from the adult mice. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA of the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of counted cells per groups (N), the mean value (X), standard deviation (SD), standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

a=p<0,01 b=p<0,001

TM, %DNA, TL: Control (Controllo)>Exposed (Esposto)

TL: ExposedK (EspostoK)> Exposed (Esposto)

TM: Exposed (Esposto)> ExposedK (EspostoK)

%DNA: Control (Controllo)>ControlK (ControlloK)

TL: ControlK (ControlloK)> Control (Controllo)

TM, %DNA, TL: ControlK (ControlloK)> ExposedK (EspostoK)

Nel gruppo esposto sono presenti valori di tutti e tre i parametri significativamente meno elevati che nel gruppo controllo (TM: $H=78,70$, $p<0,0001$; %DNA: $H=110,73$, $p<0,0001$; TL: $H=46,85$, $p<0,0001$). Il valore medio di Tail Length nel gruppo esposto trattato con proteinasi K risulta significativamente più elevato rispetto a quello del gruppo esposto non trattato con proteinasi K ($H=19,82$, $p<0,0001$). Nel gruppo esposto è stato misurato un valore medio di TM significativamente più elevato che non nel gruppo esposto trattato con proteinasi K ($H=7,17$, $p=0,007$). Il valore di Tail Moment, valore riassuntivo rispetto a quello della percentuale di DNA e della lunghezza della coda delle comete, non è risultato significativamente differente nel confronto fra il gruppo controllo trattato con proteinasi K e quello controllo non trattato con proteinasi K ($H=0,13$, $p=0,72$). Il valore medio della %DNA nella coda misurato nel gruppo controllo è risultato significativamente più elevato di quello del gruppo controllo trattato con proteinasi K ($H=29,71$, $p<0,0001$), mentre il valore del Tail Length è risultato significativamente più elevato nel gruppo controllo trattato con proteinasi K che nel gruppo controllo non trattato ($H=34,66$, $p<0,0001$). I valori medi di Tail Moment, % di DNA e Tail Length rilevati nel gruppo esposto trattato con proteinasi K sono significativamente meno elevati rispetto a quelli del gruppo controllo trattato con proteinasi K (TM: $H=37,48$, $p<0,0001$; %DNA: $H=17,75$, $p<0,0001$; TL: $H=55,24$, $p<0,0001$).

La percentuale di valori pari a zero, ovvero di cellule non danneggiate, è significativamente maggiore nel gruppo esposto rispetto a quella del gruppo controllo per tutti e tre i parametri (TM: $\chi^2=50,29$, $p<0,0001$; %DNA: $\chi^2=104,76$, $p<0,0001$; TL: $\chi^2=11,80$, $p=0,0006$). La percentuale di cellule con valore pari a zero per tutti e tre parametri è significativamente più elevata nel gruppo esposto che nel gruppo esposto trattato con proteinasi K (TM: $\chi^2=11,14$, $p=0,0008$; %DNA: $\chi^2=3,91$, $p=0,048$; TL: $\chi^2=736,51$, $p<0,0001$). Inoltre, per tutti e tre i parametri, la percentuale di cellule con valore pari a zero osservata nel gruppo esposto trattato con proteinasi K è significativamente più elevata di quella del gruppo controllo trattato con proteinasi K (TM: $\chi^2=24,92$, $p<0,0001$; %DNA: $\chi^2=12,39$, $p=0,0004$; TL: $19,42$, $p<0,0001$).

La percentuale di valori di TM pari a zero non mostra differenze significative tra il gruppo controllo e il controllo trattato con proteinasi K ($H=3,06$, $p=0,08$). La percentuale di cellule con DNA non danneggiato (valori dei parametri calcolati pari a zero) osservata nel gruppo controllo è significativamente più elevata di quella del gruppo controllo trattato con proteinasi K per quello che riguarda i parametri %DNA e TL (rispettivamente: $H=18,12$, $p<0,0001$; $H=8,45$, $p=0,0037$).

3.2.2 Sangue Neonati.

I valori medi, misurati nel sangue per ciascun individuo, di tutti e tre i parametri riportati in tabella 15 sono rappresentati graficamente per confrontare la dispersione dei valori relativi al gruppo di neonati esposti e ai controlli (Figg. 37, 38, 39).

Si può notare come i valori medi per individuo relativi al gruppo controllo siano tendenzialmente più elevati rispetto a quelli del gruppo esposto per tutti e tre i parametri scelti.

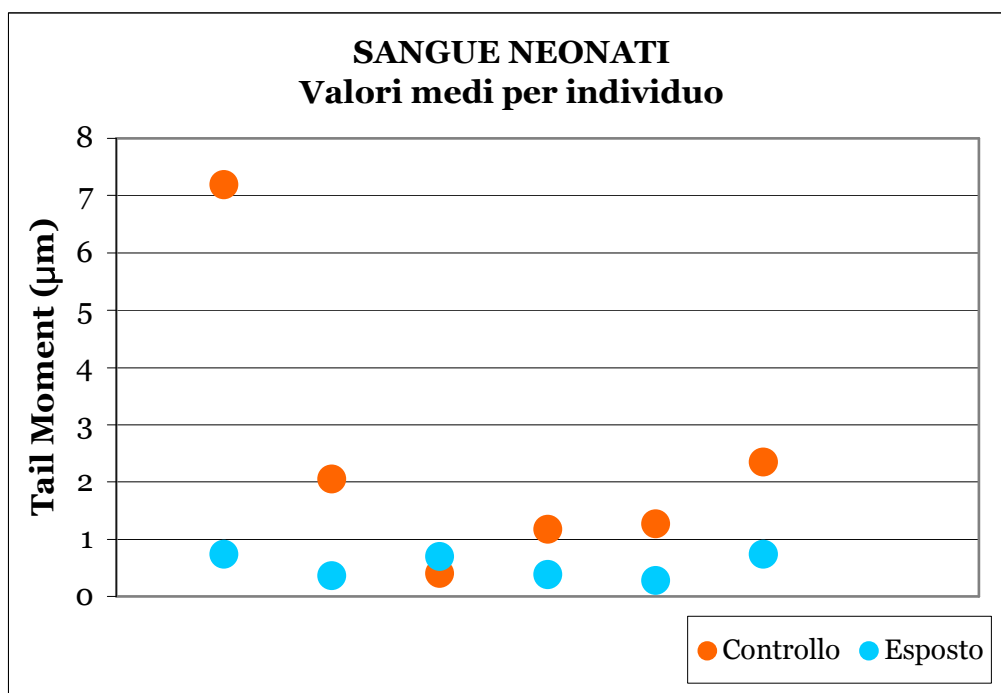


Fig. 37: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio del Tail Moment (μm) per ogni individuo dei due gruppi analizzati.

Fig. 37: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Moment (μm) per each individual of the control and exposed group.

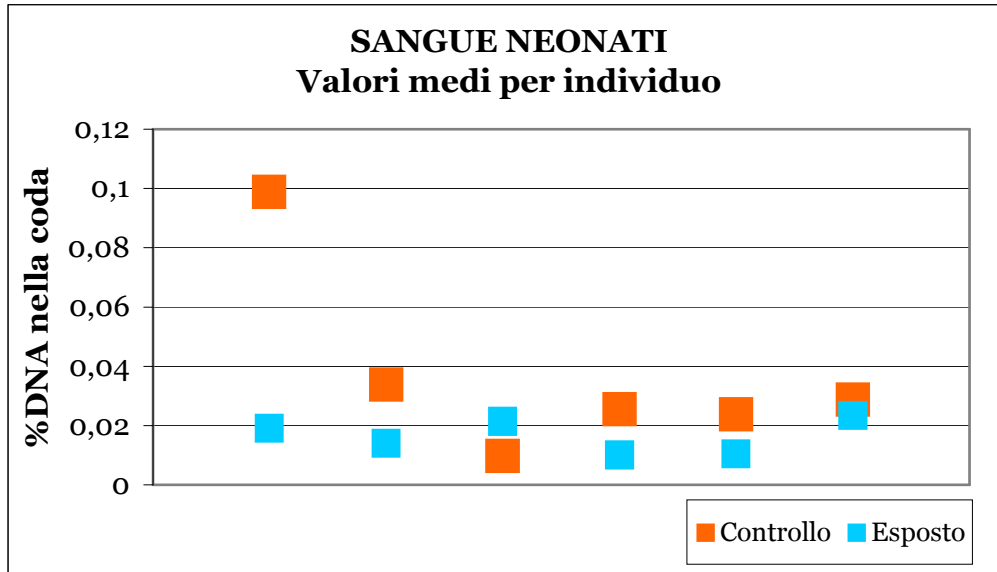


Fig. 38: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio della % di DNA nella coda per ogni individuo dei due gruppi analizzati.
Fig. 38: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of the % of DNA in the tail per each individual of the control and exposed group.

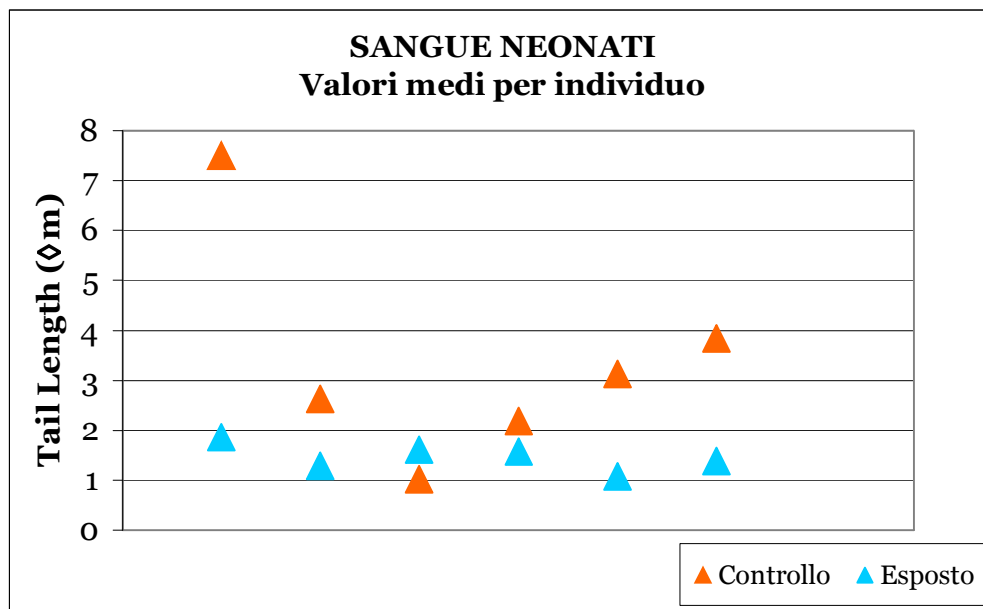


Fig. 39: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Grafico di dispersione. Ogni punto del grafico rappresenta il valore medio del Tail Length (μm) per ogni individuo dei due gruppi analizzati.
Fig. 39: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Scattering graph. Each point of the graph represent the mean value of Tail Length (μm) per each individual of the control and exposed group.

SANGUE NEONATI Medie per individuo

Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401	100	7,19	0,18	16,75	1,68	0,00	77,50
C402	100	2,05	0,02	8,31	0,83	0,00	62,78
C404	100	0,40	0,03	2,08	0,21	0,00	20,56
C406	100	1,18	0,12	4,64	0,46	0,00	31,92
C502	100	2,35	0,03	12,31	1,23	0,00	99,54
C503	100	1,26	0,04	4,73	0,47	0,00	40,57
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401	100	0,10	0,01	0,21	0,021	0,00	0,82
C402	100	0,03	0,00	0,12	0,012	0,00	0,90
C404	100	0,01	0,00	0,04	0,004	0,00	0,35
C406	100	0,03	0,01	0,07	0,007	0,00	0,48
C502	100	0,03	0,00	0,11	0,011	0,00	0,80
C503	100	0,02	0,00	0,06	0,006	0,00	0,45
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401	100	7,50	1,64	14,15	1,41	0,00	62,73
C402	100	2,63	0,41	7,29	0,73	0,00	44,69
C404	100	1,03	0,00	2,34	0,23	0,00	19,27
C406	100	2,19	0,82	4,43	0,44	0,00	27,47
C502	100	3,83	0,82	11,84	1,18	0,00	76,26
C503	100	3,12	1,23	8,02	0,80	0,00	72,57
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403	100	0,73	0,11	2,26	0,226	0,00	19,43
MA404	100	0,36	0,12	0,52	0,052	0,00	1,95
MA501	100	0,28	0,05	0,57	0,057	0,00	3,53
MA502	100	0,74	0,06	3,61	0,36	0,00	33,56
MA405	100	0,70	0,04	2,80	0,28	0,00	22,56
MA406	100	0,38	0,02	1,70	0,170	0,00	16,17
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403	100	0,02	0,01	0,04	0,004	0,00	0,32
MA404	100	0,01	0,01	0,02	0,002	0,00	0,07
MA501	100	0,01	0,00	0,02	0,002	0,00	0,11
MA502	100	0,02	0,00	0,07	0,01	0,00	0,58
MA405	100	0,02	0,00	0,06	0,01	0,00	0,42
MA406	100	0,01	0,00	0,03	0,003	0,00	0,28
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403	100	1,85	1,23	2,77	0,277	0,00	18,04
MA404	100	1,29	0,82	1,49	0,149	0,00	8,61
MA501	100	1,07	0,41	1,45	0,145	0,00	6,97
MA502	100	1,38	0,41	3,49	0,35	0,00	29,11
MA405	100	1,61	0,82	4,07	0,41	0,00	35,67
MA406	100	1,57	0,82	3,01	0,301	0,00	21,32

SANGUE NEONATI (con proteinasi K) Medie per individuo							
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401 K	100	4,86	0,06	17,14	1,71	0,00	141,07
C402 K	100	1,37	0,00	6,30	0,63	0,00	41,33
C404 K	100	1,99	0,04	12,12	1,21	0,00	108,72
C406 K	100	0,39	0,05	1,92	0,19	0,00	19,10
C502 K	100	1,91	0,04	9,44	0,94	0,00	86,58
C503 K	100	2,02	0,06	7,67	0,77	0,00	59,59
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401 K	100	0,06	0,01	0,15	0,02	0,00	0,95
C402 K	100	0,03	0,01	0,11	0,01	0,00	0,70
C404 K	100	0,03	0,01	0,12	0,01	0,00	0,94
C406 K	100	0,01	0,01	0,03	0,00	0,00	0,33
C502 K	100	0,03	0,01	0,10	0,01	0,00	0,69
C503 K	100	0,03	0,01	0,09	0,01	0,00	0,61
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
C401 K	100	5,47	1,23	13,28	1,33	0,00	95,53
C402 K	100	1,82	0,01	5,61	0,56	0,00	35,67
C404 K	100	2,44	0,62	8,96	0,90	0,00	76,67
C406 K	100	1,38	0,82	2,37	0,24	0,00	18,86
C502 K	100	3,04	0,82	9,30	0,93	0,00	83,64
C503 K	100	3,79	1,44	7,78	0,78	0,00	56,17
Tail Moment							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403 K	100	1,61	0,08	6,35	0,64	0,00	50,68
MA404 K	100	3,79	0,06	9,71	0,97	0,00	53,53
MA501 K	100	0,53	0,05	1,36	0,14	0,00	10,23
MA502 K	100	0,42	0,02	1,36	0,14	0,00	11,59
MA405 K	100	1,27	0,35	3,08	0,31	0,00	21,67
MA406 K	100	0,65	0,17	2,57	0,26	0,00	25,17
%DNA nella coda							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403 K	100	0,03	0,01	0,10	0,010	0,00	0,66
MA404 K	100	0,06	0,01	0,13	0,013	0,00	0,63
MA501 K	100	0,02	0,01	0,04	0,004	0,00	0,24
MA502 K	100	0,01	0,01	0,03	0,003	0,00	0,24
MA405 K	100	0,03	0,02	0,05	0,005	0,00	0,33
MA406 K	100	0,02	0,01	0,04	0,004	0,00	0,33
Tail Length							
	N	X	Mediana	SD	SE	Minimo	Massimo
MA403 K	100	2,86	1,23	5,74	0,57	0,00	41,00
MA404 K	100	5,51	1,23	10,68	1,07	0,00	61,50
MA501 K	100	1,36	0,82	2,09	0,21	0,00	12,30
MA502 K	100	1,27	0,41	2,50	0,25	0,00	17,63
MA405 K	100	2,58	1,64	3,48	0,35	0,00	24,19
MA406 K	100	2,13	1,44	3,10	0,31	0,00	25,01

Tab. 15: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Per ognuno dei tre parametri analizzati sono riportati, per ciascun individuo: sigla identificativa, numero di cellule contate (N) il valore medio (X) e la mediana del parametro, la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio, il valore minimo e massimo.

Tab. 15: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. For each analysed parameters the animal's code, the number of counted cells per animal (N), the mean (X) and median values, the standard deviation (SD) and the standard error (SE) of means, the minimum and maximum value for each animal involved in the experiment are shown.

In tabella 16 sono riportati i confronti fra i valori medi di TM, % di DNA nella coda e TL dei quattro gruppi utilizzati nell'esperimento.

SANGUE NEONATI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	6	2,40 ^a	2,44	1,00	0,40	7,19
Esposto	6	0,53	0,21	0,09	0,28	0,74
Controllo K	6	2,09	1,49	0,61	0,39	4,86
Esposto K	6	1,38	1,27	0,52	0,42	3,79
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	6	0,04	0,03	0,01	0,01	0,10
Esposto	6	0,02	0,01	0,002	0,01	0,02
Controllo K	6	0,03	0,02	0,01	0,01	0,06
Esposto K	6	0,03	0,02	0,01	0,01	0,06
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	6	3,38 ^a	2,23	0,91	1,03	7,50
Esposto	6	1,46	0,27	0,11	1,07	1,85
Controllo K	6	2,99	1,49	0,61	1,38	5,47
Esposto K	6	2,62	1,56	0,64	1,27	5,51

Tab. 16: Comet assay sul sangue degli animali neonati. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length) il numero di individui per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per i quattro gruppi considerati.

$a=p<0,05$

TM, TL: Controllo >Esposto

Tab. 16: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA in the tail and Tail Length) in the table are shown: the number of individual per group (N), the mean value (X), standard deviations (SD) and standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

$a=p<0,05$

TM, TL: Control (Controllo) >Exposed (Esposito)

Il valore medio di Tail Moment e di Tail Length del gruppo controllo (Figg. 40, 41) è risultato significativamente più elevato rispetto a quello del gruppo dei neonati esposti (TM: $t=2,83$, $p=0,017$; TL: $t=2,43$, $p=0,035$). E ciò conferma la tendenza messa precedentemente in evidenza nei grafici di dispersione.

Nessuna differenza statisticamente significativa è risultata dal confronto dei valori medi dei tre parametri misurati nel gruppo controllo trattato con proteinasi K e nel gruppo controllo non trattato con proteinasi K (TM: $t=0,007$, $p=0,99$; %DNA: $t=0,15$, $p=0,88$; TL: $t=0,16$, $p=0,87$).

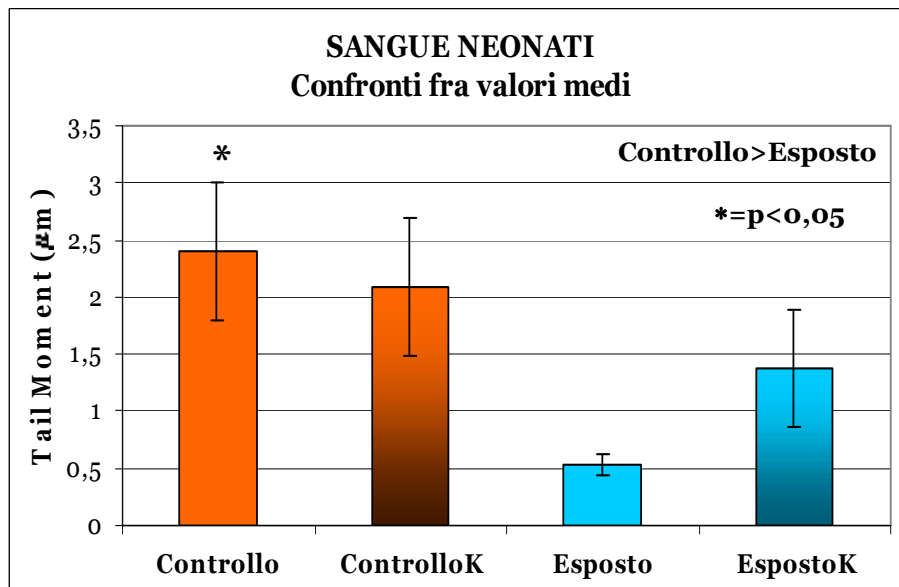


Fig. 40: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi di Tail Moment (μm) per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

*= $p < 0,05$ Controllo>Esposto

Fig. 40: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Comparison between the mean values of Tail Moment (μm) of each of the four analysed groups.

*= $p < 0,05$ Control (Controllo) > Exposed (Esposto)

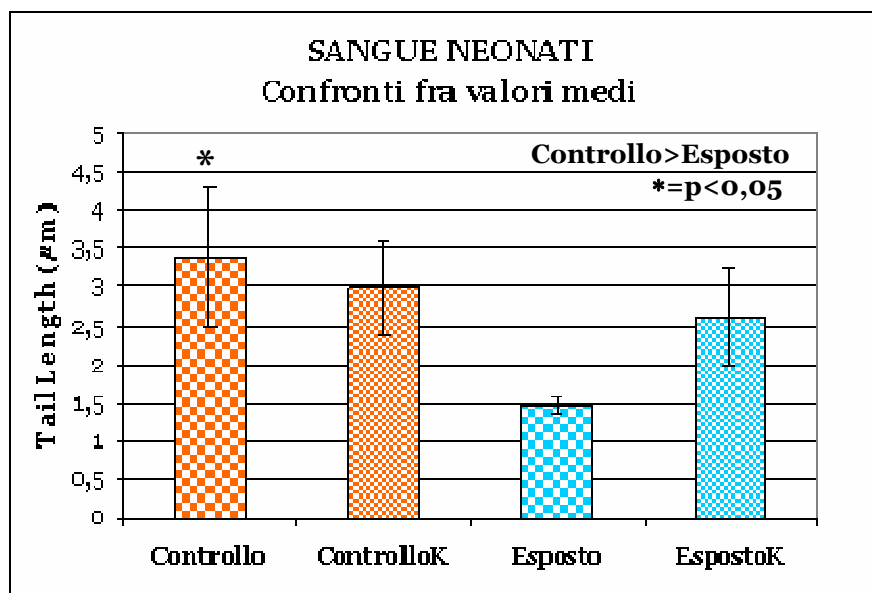


Fig. 41: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Sono rappresentati i confronti fra i valori medi di Tail Length (μm) per ognuno dei quattro gruppi analizzati.

*= $p < 0,05$ Controllo>Esposto

Fig 41: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Comparison between the mean values of Tail Length (μm) of each of the four analysed groups.

*= $p < 0,05$ Control (Controllo) > Exposed (Esposto)

Il confronto nella distribuzione dei valori delle singole cellule del gruppo esposto (N = 600) e del gruppo controllo (N = 600) per TM, %DNA nella coda e TL è illustrato nelle figure 42, 43 e 44. Sebbene ci sia una prevalenza di cellule con valori bassi dei parametri in entrambi i gruppi, la distribuzione dei valori rilevati nel gruppo controllo ha un range più ampio rispetto a quello del gruppo esposto.

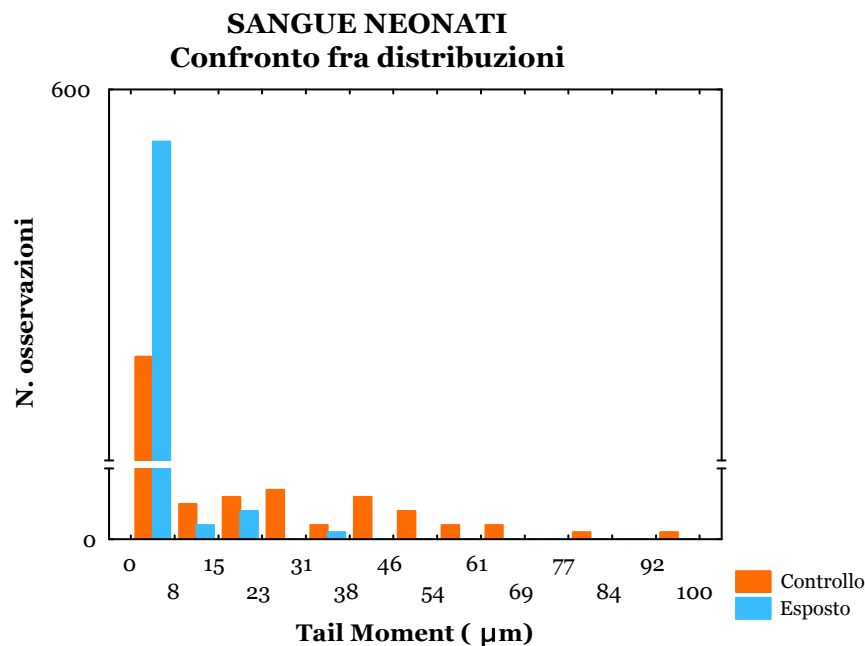


Fig. 42: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Moment riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Moment in μm .

Fig. 42: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Comparison of frequency distribution of Tail Moment of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Moment values, in μm , are reported on the x axis.

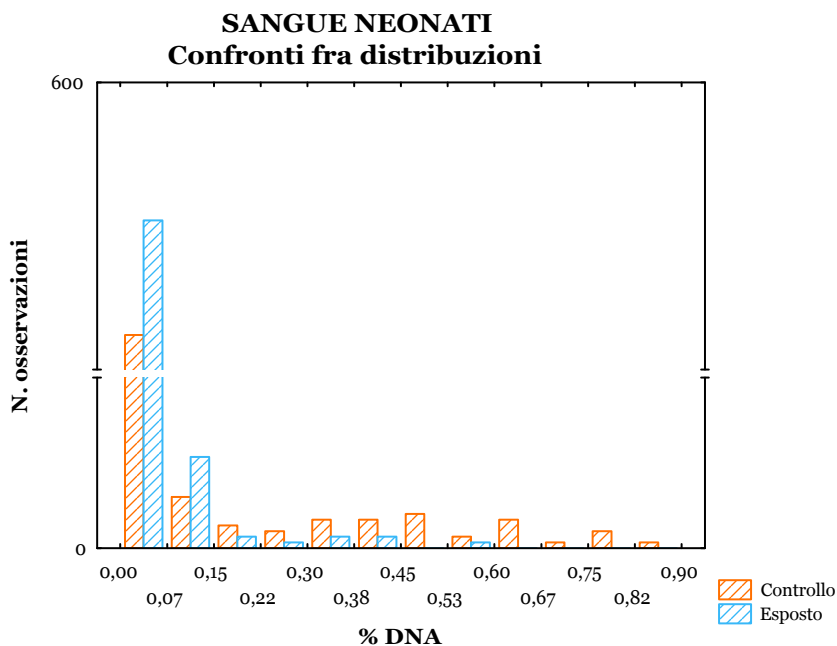


Fig. 43: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori della % di DNA nella coda riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore della % di DNA nella coda.

Fig. 43: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Comparison of frequency distribution of the % of DNA in the tail of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the % of DNA in the tail values, are reported on the x axis.

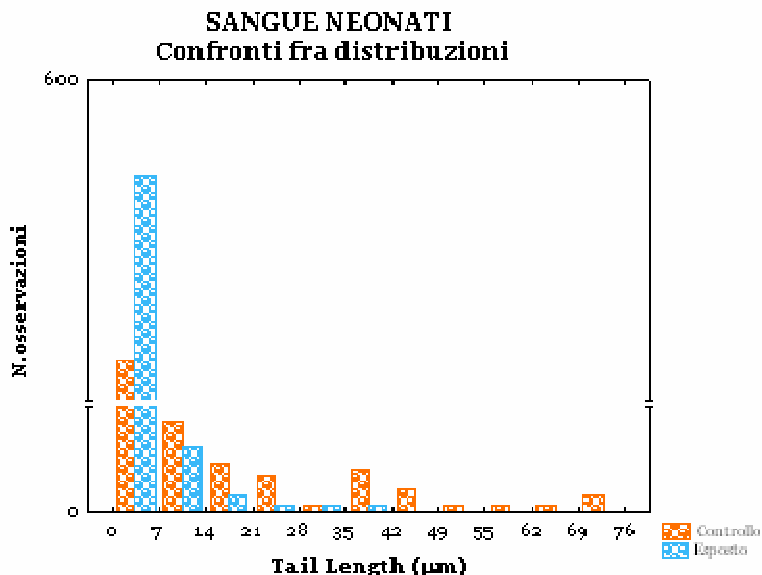


Fig. 44: Comet assay sul sangue degli animali neonati. Confronto fra le distribuzioni delle frequenze dei valori di Tail Length riferiti alle singole cellule analizzate nel gruppo controllo e nel gruppo esposto. Sull'asse delle ordinate (y) è riportata la frequenza delle osservazioni effettuate mentre sull'asse delle ascisse (x) il valore di Tail Length in µm.

Fig. 44: Comet assay on peripheral blood cells from the new-born animals. Comparison of frequency distribution of Tail Length of all analysed cells in control and exposed groups. The observations frequency is shown on the y axis and the Tail Length values, in µm, are reported on the x axis.

Tuttavia il confronto dei valori medi riportati in tabella 17, relativi a tutte le cellule analizzate nei due gruppi, controllo ed esposto, non mostra differenze statisticamente significative per nessuno dei tre parametri utilizzati.

SANGUE NEONATI						
Tail Moment						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	600	2,40	9,79	0,40	0	99,54
Esposto	600	0,53	2,22	0,09	0	33,56
Controllo K	600	2,09 ^c	10,31	0,42	0	141,07
Esposto K	600	1,38 ^c	5,18	0,21	0	53,53
% DNA nella coda						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	600	0,04	0,12	0,005	0	0,90
Esposto	600	0,02	0,04	0,002	0	0,58
Controllo K	600	0,03 ^c	0,11	0,004	0	0,95
Esposto K	600	0,03 ^a	0,08	0,003	0	0,66
Tail Length						
	N	X	SD	SE	Minimo	Massimo
Controllo	600	3,38	9,16	0,37	0	76,26
Esposto	600	1,46	2,88	0,12	0	35,67
Controllo K	600	2,99 ^b	8,64	0,35	0	95,53
Esposto K	600	2,62 ^c	5,63	0,23	0	61,50

Tab. 17: Comet assay sul sangue dei topi neonati. La tabella mostra per ciascuno dei tre parametri analizzati (Tail Moment, % di DNA nella coda, Tail Length) il numero di cellule contate per gruppo (N), il valore medio (X), la deviazione standard (SD) e l'errore standard (SE) associati al valore medio. Nelle ultime due colonne sono riportati il valore minimo e massimo registrati per ognuno dei tre parametri per le cellule dei quattro gruppi considerati.

a=p<0,05 b=p<0,01 c=p<0,001

TM, %DNA, TL: EspostoK>Esposto

TM, %DNA, TL: ControlloK>EspostoK

Tab. 17: Comet assay on peripheral blood cell from the new-born mice. For each of the three analysed parameters (Tail Moment, % of DNA of the tail, Tail Length) in the table are shown: the number of counted cells per groups (N), the mean value (X), standard deviation (SD), standard error (SE) of mean values. The minimum and maximum value for each of the three parameters of all of the four analysed groups are listed in the last two columns.

a=p<0,05 b=p<0,01 c=p<0,001

TM, %DNA, TL: ExposedK (EspostoK)>Exposed (Esposto)

TM, %DNA, TL: ControlK (ControlloK)>ExposedK (EspostoK)

Inoltre nessuna differenza significativa è stata messa in evidenza dal confronto dei valori medi di tutti e tre i parametri del gruppo controllo e del gruppo controllo trattato con proteinasi K (TM: $H=1,75$, $p=0,18$; %DNA: $H=2,33$, $p=0,13$; TL: $H=0,50$, $p=0,48$). I valori medi di Tail Moment, percentuale di DNA nella coda e Tail Length osservati nel gruppo esposto trattato con proteinasi K sono risultati significativamente più elevati di quelli del gruppo esposto non trattato con proteinasi K (TM: $H=11,34$; $p=0,0008$; %DNA: $H=4,66$, $p=0,03$; TL: $H=16,09$, $p=0,0001$). Questo risultato permette di ipotizzare la presenza di crosslinks nel DNA delle cellule del sangue del gruppo esposto messa in evidenza dall'azione della proteinasi K. I valori medi, per i tre parametri utilizzati, del gruppo controllo trattato con proteinasi K sono significativamente più elevati di quelli del gruppo esposto trattato con proteinasi K (TM: $H=17,96$, $p<0,0001$; %DNA: $H=16,56$, $p<0,0001$; TL: $H=6,56$, $p=0,01$).

Per tutti i parametri misurati una percentuale significativamente più elevata di cellule senza danno al DNA (valori dei parametri pari a zero) è presente nel gruppo controllo trattato con proteinasi K rispetto a quella presente nel gruppo esposto trattato con proteinasi K (TM: $\chi^2=12,41$, $p=0,0004$; %DNA: $\chi^2=16,36$, $p<0,0001$; TL: $\chi^2=5,89$, $p=0,015$). Dal confronto fra il gruppo esposto ed il gruppo esposto trattato con proteinasi K emerge che nel primo gruppo è presente una percentuale maggiore di cellule con valori pari a zero di Tail Moment e percentuale di DNA nella coda che non nel secondo (TM: $\chi^2=4,39$, $p=0,036$; %DNA: $\chi^2=5,33$, $p=0,021$).

3.2.3 Incremento proporzionale

Anche in questo caso, come in precedenza per i risultati ottenuti nel cervello, si è espressa la variazione del livello di danno, registrato in seguito all'esposizione alle radiazioni magnetiche, come il rapporto, in valore assoluto, fra il valore medio del parametro per il gruppo esposto e quello per il gruppo controllo (Tab. 18, Figg. 45, 46, 47).

SANGUE		
	ADULTI	NEONATI
TM	1,9	4,5
%DNA nella coda	1,6	2
TL	1,7	2,3

Tab. 18: In tabella sono riportati i rapporti esposto/controllo dei tre parametri misurati nel sangue di adulti e neonati.

Tab. 18: Table shows the values of the exposed/control ratio of the three parameters measured in blood from adults and new-borns.

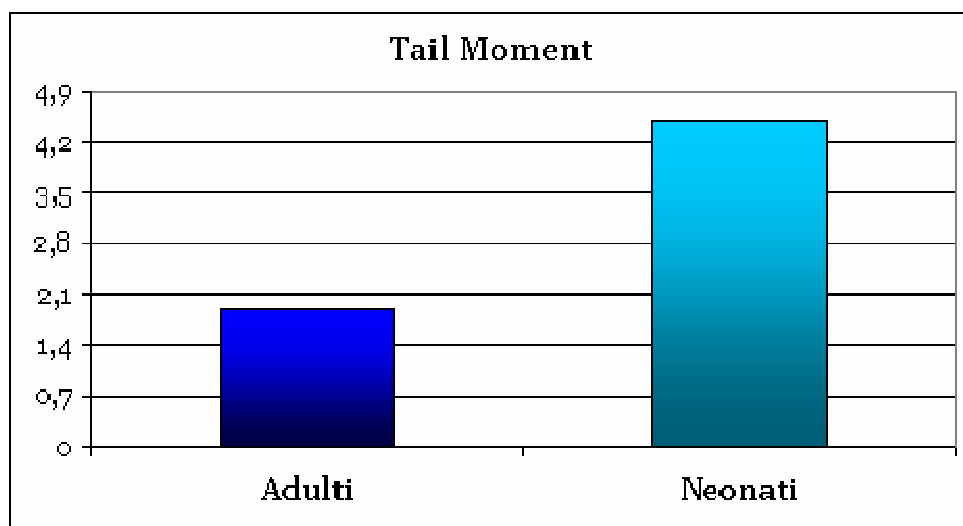


Fig. 45: Confronto della risposta ottenuta con il Comet assay nel sangue degli animali adulti e neonati. Gli istogrammi rappresentano l'incremento della risposta ottenuta calcolato come rapporto fra il valore medio di Tail Moment del gruppo esposto e del gruppo controllo (TM esposto/TM controllo) in valore assoluto.

Fig. 45: Comparison between the response of adult and new-born mice measured with the Comet assay on peripheral blood cells. The histogram represent the increment of the response obtained as the ratio between the mean value of Tail Moment of the exposed group and the control one (TM exposed/TM control) expressed in absolute value.

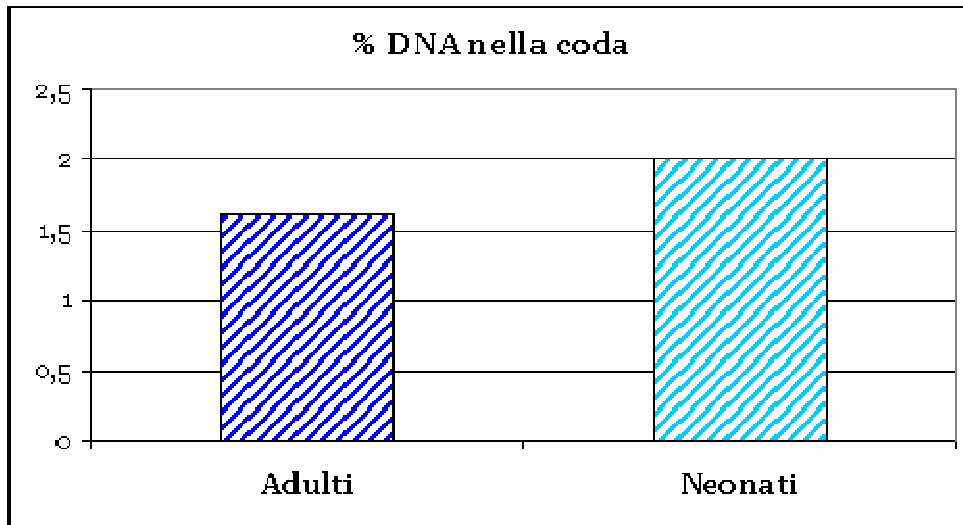


Fig. 46: Confronto della risposta ottenuta con il *Comet assay* nel sangue degli animali adulti e neonati. Gli istogrammi rappresentano l'incremento della risposta ottenuta calcolato come rapporto fra il valore medio della % di DNA nella coda del gruppo esposto e del gruppo controllo (%DNA esposto/%DNA controllo) in valore assoluto.

Fig. 46: Comparison between the response of adult and new-born mice measured with the Comet assay on peripheral blood cells. The histogram represent the increment of the response obtained as the ratio between the mean value of the % of DNA in the tail of the exposed group and the control one (%DNA exposed/%DNA control) expressed in absolute value.

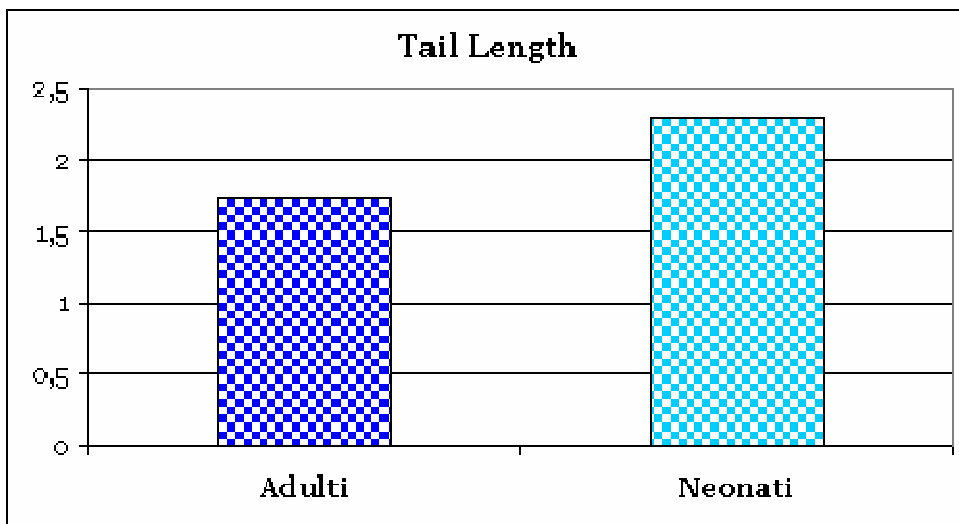


Fig. 47: Confronto della risposta ottenuta con il *Comet assay* nel sangue degli animali adulti e neonati. Gli istogrammi rappresentano l'incremento della risposta ottenuta calcolato come rapporto fra il valore medio di Tail Length del gruppo esposto e del gruppo controllo (TL esposto/TL controllo) in valore assoluto.

Fig. 47: Comparison between the response of adult and new-born mice measured with the Comet assay on peripheral blood cells. The histogram represent the increment of the response obtained as the ratio between the mean value of Tail Length of the exposed group and the control one (TL exposed/TL control) expressed in absolute value.

Anche nel sangue, come nel cervello, la risposta ottenuta nei topi neonati è sempre risultata più forte di quella osservata negli animali adulti. Infatti mentre nei neonati il rapporto fra il valore medio di Tail Moment nei due gruppi, esposto e controllo, è pari a 4,5 esso si riduce a 1,9 negli animali adulti. Questa differenza rimane presente, anche se è meno forte, quando si considerano i valori dei rapporti per gli altri due parametri utilizzati. Infatti, per la percentuale di DNA nella coda il valore del rapporto, che è pari a 2 nei neonati, diminuisce al valore di 1,6 per gli adulti. Il valore del rapporto per il Tail Length è 2,3 nel gruppo dei topi neonati mentre è pari a 1,74 nel gruppo degli adulti.

3.3 Linfociti umani

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti nello studio sullo stress ossidativo indotto da H_2O_2 e ormoni su linfociti di donatori sani e di pazienti con vitiligine.

Le popolazioni incluse nella ricerca sono state contrassegnate dalle sigle sotto riportate:

POPY: pazienti con vitiligine mai sottoposti a trattamento.

POPX: pazienti con vitiligine per i quali il trattamento con pseudo-catalasi attivata da UVB ($0,15 \text{ mJ/cm}^2$) non è risultato efficace.

POPA: pazienti con vitiligine che hanno risposto efficacemente al trattamento pseudo-catalasi attivata da UVB ($0,15 \text{ mJ/cm}^2$).

POPZ: popolazione controllo di donatori sani.

3.3.1 Curve dose risposta

Perossido di idrogeno: Come si può vedere nella tabella 19 i valori medi di Tail Moment (TM) misurati dopo l'esposizione ad H_2O_2 aumentano tendenzialmente con l'aumentare della concentrazione in tutte le popolazioni studiate.

Nella popolazione controllo (POP Z), l'incremento dei valori medi di TM rispetto al valore controllo risulta statisticamente significativo a partire dalla concentrazione di $40 \mu\text{M}$ di H_2O_2 ($t=7,48$, $p=0,0003$). Anche il valore medio di TM misurato a $60 \mu\text{M}$, in questa stessa popolazione, è risultato statisticamente più elevato di quello della dose controllo ($t=6,82$, $p=0,0005$) (Tab.19, Fig. 48).

In POP A, l'incremento del valore di TM, risulta statisticamente significativo già a partire dalla concentrazione di $5 \mu\text{M}$ di H_2O_2 ($t=4,53$, $p=0,0011$). In questa stessa popolazione il valore medio di TM alle concentrazioni di 10, 20, 40, 60 μM è significativamente più elevato di quello controllo (10 μM : $t=4,86$, $p=0,0006$; 20 μM : $t=11,07$, $p<0,0001$; 40 μM : $t=9,73$, $p<0,0001$; 60 μM : $t=7,89$, $p<0,0001$) (Tab. 19, Fig. 48). L'incremento del danno al DNA in POP Y e POP X col crescere della concentrazione di perossido di idrogeno non è mai risultato statisticamente significativo.

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione X (N = 8)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,86	23,55 \pm 3,99	19,88	20,48 \pm 4,79	16,37	1,70 \pm 0,38	0,69
k 5: μ M H ₂ O ₂	8,42 \pm 1,00	3,44	25,43 \pm 5,95	19,58	22,27 \pm 5,16	18,08	3,60 \pm 1,36	1,29
l 10: μ M H ₂ O ₂	9,54 \pm 1,10	4,04	26,24 \pm 4,18	19,83	21,49 \pm 4,67	17,91	5,99 \pm 2,37	3,14
m 20 : μ M H ₂ O ₂	10,93 \pm 0,67	4,57	27,11 \pm 4,14	21,45	19,31 \pm 3,35	12,44	9,30 \pm 3,65	6,17
n 40: μ M H ₂ O ₂	19,67 \pm 1,51	10,69	28,93 \pm 4,99	24,40	27,00 \pm 5,64	23,15	14,59 \pm 1,97	9,77
o 60: μ M H ₂ O ₂	18,34 \pm 1,35	9,75	31,03 \pm 6,53	27,86	23,26 \pm 3,73	17,79	17,42 \pm 2,31	11,80
	a-k	p<0,01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	a-l	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	a-m	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	a-n	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,001
	a-o	p<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,001

Tab. 19: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, i valori medi \pm SE e le mediane del TM di ogni concentrazione di perossido di idrogeno testata. E' inoltre indicato il numero di individui di ogni popolazione. Per ogni concentrazione il TM è stato confrontato con il controllo e i confronti risultati statisticamente significativi sono riportati nella parte inferiore della tabella.

n.s.= non significativo

Tab. 19: The mean \pm SE and median values of TM of each concentration of hydrogen peroxide are shown for all the population. The number of individuals per each population is also reported. For each concentration TM was tested versus control. Statistically significant results are shown at the bottom of the table.

n.s. = no significant.

H₂O₂ dose risposta

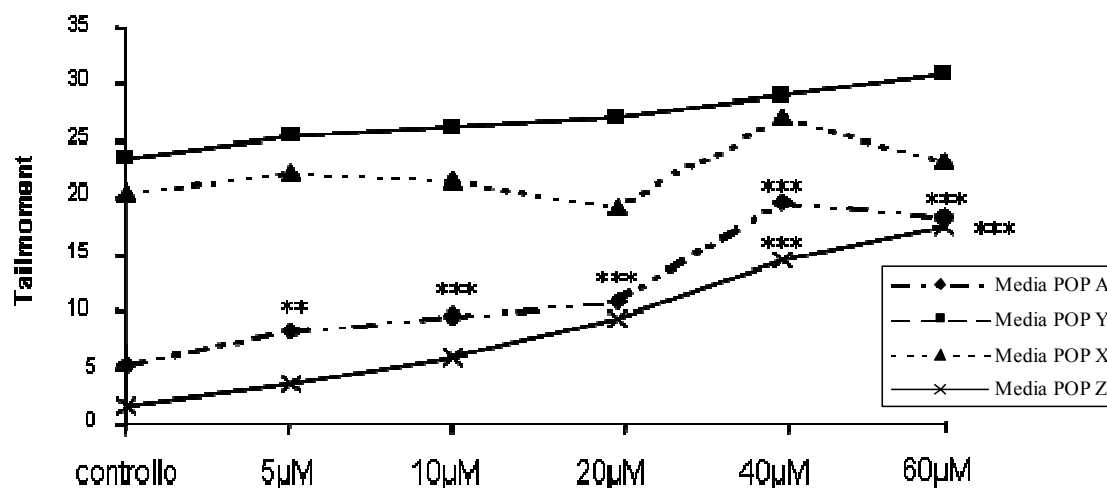


Fig. 48: Il grafico indica per ogni popolazione i valori di TM registrati alle concentrazioni di perossido di idrogeno usate nell'esperimento. * indica quali concentrazioni danneggiano significativamente il DNA delle cellule.

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

Fig. 48: For each population the value of TM measured at the different tested doses of hydrogen peroxide can be extrapolated from the graph. * reveal which concentration damage the DNA in a statistically significant extent.

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

Estrogeno: Il danno al DNA registrato a 75 e 100 µM in POP Z (rispettivamente $t=2,55$, $p=0,043$ e $t=8,55$, $p=0,0001$) e in POP A (rispettivamente $t=2,61$, $p=0,026$ e $t=2,79$, $p=0,02$) è significativamente maggiore di quello del controllo non trattato (Tab. 20, Fig. 49).

In POP Y il valore di TM è risultato statisticamente più elevato del controllo non trattato solo alla concentrazione di 75 µM di estrogeno ($t=2,39$, $p=0,043$), mentre nessuna differenza significativa, rispetto al controllo è stata registrata nei valori medi di TM delle concentrazioni di estrogeno in POP X (Tab. 20, Fig. 49).

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione X (N = 8)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,86	23,55 \pm 3,99	19,88	20,48 \pm 4,79	16,37	1,70 \pm 0,38	0,69
b 25: μ M estrogeno	5,26 \pm 1,25	2,56	25,64 \pm 3,12	23,62	21,27 \pm 4,51	17,54	2,15 \pm 0,4	0,71
c 50: μ M estrogeno	6,73 \pm 1,52	3,06	22,57 \pm 3,01	21,28	19,50 \pm 3,62	15,73	3,93 \pm 0,98	1,36
d 75: μ M estrogeno	6,93 \pm 1,26	2,81	30,39 \pm 3,08	29,93	25,60 \pm 3,20	21,32	5,46 \pm 1,58	1,58
e 100: μ M estrogeno	7,40 \pm 0,87	3,11	27,60 \pm 3,22	25,86	24,05 \pm 4,04	20,34	5,41 \pm 0,35	1,56
a-b	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
a-c	n.s.		n.s.		n.s.		n.s.	
a-d	n.s.		p<0,05		n.s.		p<0,05	
a-e	p<0,05		n.s.		n.s.		p<0,001	

Tab. 20: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, i valori medi \pm SE e le mediane del TM di ogni concentrazione di estrogeno testata. E' inoltre indicato il numero di individui di ogni popolazione. Per ogni concentrazione il TM è stato confrontato con il controllo e i confronti risultati statisticamente significativi sono riportati nella parte inferiore della tabella.

n.s.= non significativo

Tab. 20: The mean \pm SE and median values of TM of each concentration of oestrogen are shown for all the population. The number of individuals per each population is also reported. For each concentration TM was tested versus control. Statistically significant results are shown at the bottom of the table.

n.s. = not significant.

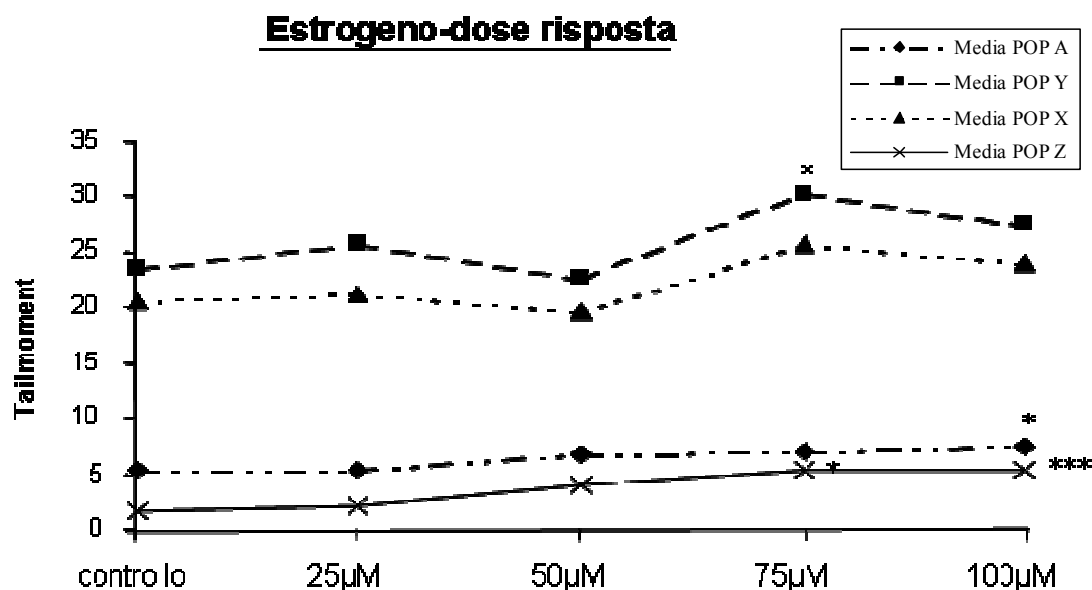


Fig. 49: Il grafico indica per ogni popolazione i valori di TM registrati alle concentrazioni di estrogeno usate nell'esperimento. * indica quali concentrazioni danneggiano significativamente il DNA delle cellule.

** = $p < 0,05$

*** = $p < 0,001$

Fig. 49: For each population the value of TM measured at the different tested doses of oestrogen can be extrapolated from the graph. * reveal which concentration damage the DNA in a statistically significant extent.

** = $p < 0,05$

*** = $p < 0,001$

Progesterone: Anche in questo caso il danno al DNA tende ad aumentare con l'aumento della dose ma questo non sempre risulta significativo (Tab. 21, Fig. 50).

Nella popolazione controllo (POP Z) i valori medi di TM di tutte le concentrazioni sono significativamente più elevati di quello della dose controllo (10 μM: $t=4,49$, $p=0,004$; 50 μM: $t=6,27$, $p=0,0007$; 75 μM: $t=2,98$, $p=0,024$; 100 μM: $t=3,43$, $p=0,014$; 150 μM: $t=1,39$, $p=0,004$). Mentre in POP A l'incremento del danno è risultato statisticamente significativo a partire dalla concentrazione di 75 μM ($t=2,61$, $p=0,026$). In questa stessa popolazione i valori medi di TM registrati per le due concentrazioni più elevate (100 e 150 μM) sono significativamente maggiori del controllo (rispettivamente: $t=2,94$, $p=0,015$ e $t=2,96$, $p=0,014$).

In POP X solo i valori medi di TM misurati a 50 μM e 75 μM di progesterone sono risultati significativamente più elevati di quello del controllo (rispettivamente: $t=2,57$, $p=0,037$ e $t=2,48$, $p=0,042$) (Tab. 21, Fig. 50).

In POP Y tre concentrazioni di progesterone (10, 75 e 150 μM) hanno determinato un incremento statisticamente significativo del danno al DNA rispetto al controllo (10 μM: $t=3,09$, $p=0,02$; 75 μM: $t=2,75$, $p=0,01$; 150 μM: $t=2,92$, $p=0,01$).

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione X (N = 8)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,86	23,55 \pm 3,99	19,88	20,48 \pm 4,79	16,37	1,70 \pm 0,38	0,69
f 10: μ M progesterone	5,64 \pm 0,69	2,11	30,14 \pm 4,64	25,46	20,63 \pm 3,85	16,31	3,68 \pm 0,68	0,90
g 50: μ M progesterone	6,36 \pm 1,48	2,66	28,10 \pm 4,44	28,05	25,65 \pm 4,48	23,26	5,15 \pm 0,61	1,27
h 75: μ M progesterone	9,63 \pm 2,06	4,42	32,28 \pm 3,50	34,32	26,82 \pm 3,62	22,63	6,55 \pm 1,84	1,87
i 100 μ M progesterone	7,09 \pm 0,90	2,45	28,84 \pm 4,41	25,88	21,62 \pm 4,46	17,85	5,09 \pm 1,26	1,45
j 150 μ M progesterone	8,90 \pm 1,53	3,71	29,50 \pm 4,29	27,63	25,01 \pm 4,72	19,90	4,07 \pm 0,62	1,40
a-f	n.s.		p<0.05		n.s.		p<0.01	
a-g	n.s.		n.s.		p<0.05		p<0.001	
a-h	p<0.05		p<0.01		p<0.05		p<0.05	
a-i	p<0.05		n.s.		n.s.		p<0.05	
a-j	p<0.05		p<0.01		n.s.		p<0.01	

Tab. 21: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, i valori medi \pm SE e le mediane del TM di ogni concentrazione di progesterone testata. E' inoltre indicato il numero di individui di ogni popolazione. Per ogni concentrazione il TM è stato confrontato con il controllo e i confronti risultati statisticamente significativi sono riportati nella parte inferiore della tabella.

n.s.= non significativo

Tab. 21: The mean \pm SE and median values of TM of each concentration of progesterone are shown for all the population. The number of individuals per each population is also reported. For each concentration TM was tested versus control. Statistically significant results are shown at the bottom of the table.

n.s. = not significant.

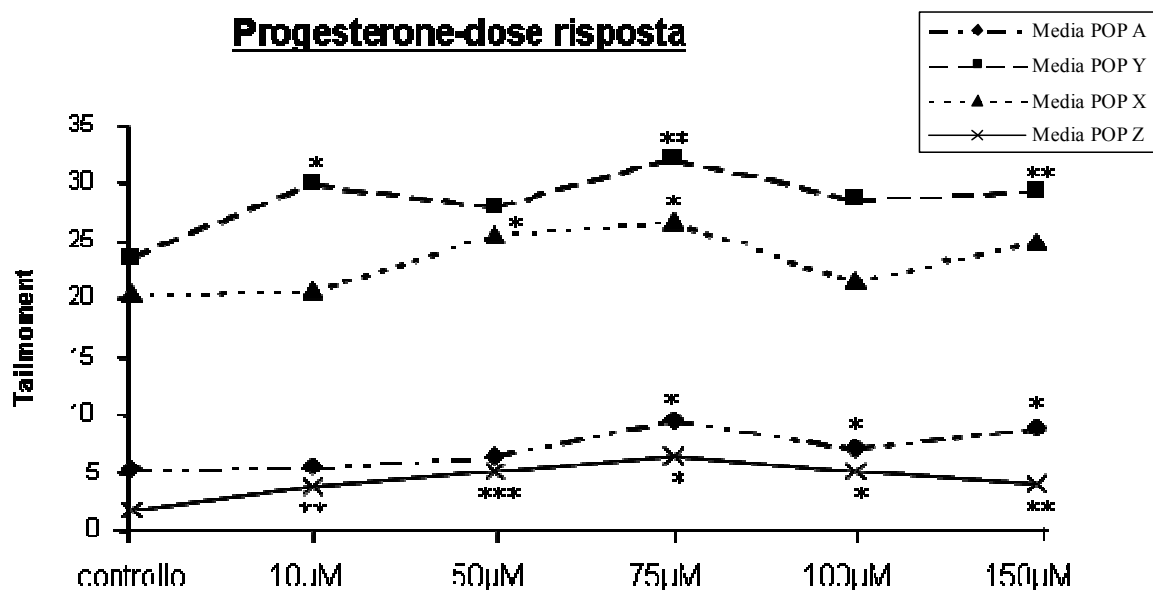


Fig. 50: Il grafico indica per ogni popolazione i valori di TM registrati alle concentrazioni di progesterone usate nell'esperimento. * indica quali concentrazioni danneggiano significativamente il DNA delle cellule.

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

Fig. 50: For each population the value of TM measured at the different tested doses of progesterone can be extrapolated from the graph. * reveal which concentration damage the DNA in a statistically significant extent.

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

3.3.2 Catalasi

Per il trattamento con la catalasi sono state scelte tre popolazioni: POP Z, POP A e POP Y.

Ci si aspettava che la catalasi riducesse il danno indotto dagli ormoni e dal perossido di idrogeno, ma questo non sempre è risultato vero. L'azione della catalasi, infatti, è risultata significativa solo nella popolazione controllo (POP Z) e in POP A. In tutte e tre le popolazioni analizzate il confronto dei valori di TM della dose controllo in presenza e in assenza di catalasi non ha evidenziato alcuna differenza significativa (POP Z: $t=1,42$, $p=0,24$; POP A: $t=0,45$, $p=0,66$; POP Y: $t=0,37$, $p=0,72$) (Tab.22, Fig. 51).

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,66	23,55 \pm 3,99	19,88	1,70 \pm 0,38	0,69
b Controllo + 250 U/ml catalasi	3,69 \pm 0,62	2,10	24,38 \pm 3,62	19,96	2,39 \pm 0,78	0,72

Tab. 22: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, il valore medio \pm SE e la mediana del TM del controllo solo e con catalasi.

Tab. 22: The mean \pm SE and median value of control and control+catalase are shown for all the population.

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,66	23,55 \pm 3,99	19,88	1,70 \pm 0,38	0,69
c 75: μ M estrogeno	6,36 \pm 1,03	3,18	30,39 \pm 3,08	29,93	5,46 \pm 1,58	1,58
d 75: μ M estrogeno + 250 U/ml catalasi	5,22 \pm 0,83	2,16	25,72 \pm 3,55	22,69	2,45 \pm 0,51	0,77
	a-c	p<0,05	p<0,05		p<0,05	
	c-d	p<0,05	n.s.		P<0,05	

Tab. 23: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, il valore medio \pm SE e la mediana del TM di 75 μ M di estrogeno con e senza catalasi. E' inoltre indicato il numero di individui di ogni popolazione. I confronti incrociati risultati statisticamente significativi sono riportati nella parte inferiore della tabella.

n.s.= non significativo

Tab. 23: The mean \pm SE and median value of TM of 75 μ M oestrogen alone or combined with catalase are shown for all the population. The number of individuals per each population is also reported. Statistically significant comparisons are shown at the bottom of the table.

n.s. = not significant.

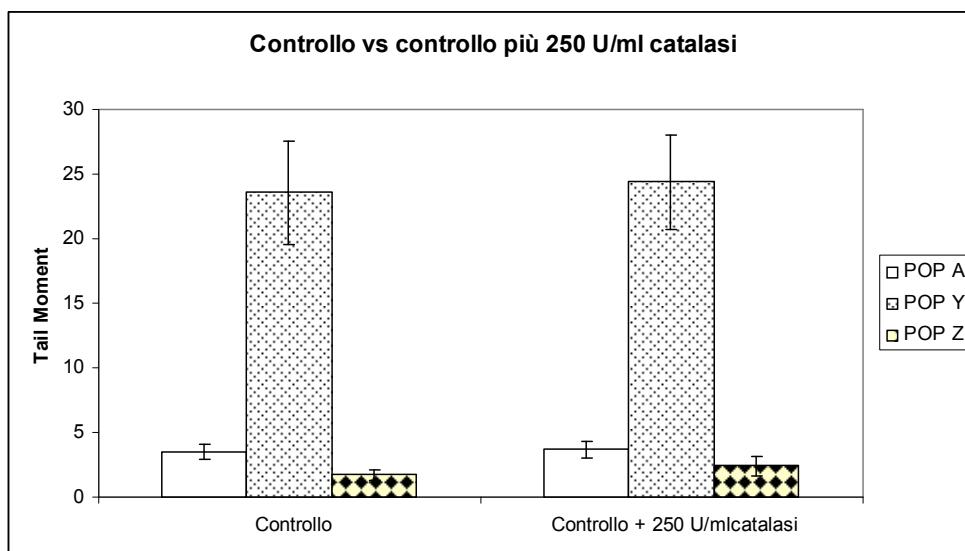


Fig. 51: Dal grafico si evince che i valori del TM del controllo e del controllo+catalasi non differiscono in maniera statisticamente significativa.

Fig. 51: The graph shows no significant difference between the TM in control and in control+catalase.

Estrogeno: Nella popolazione controllo (POP Z) ed in POP A il valore di TM della concentrazione di 75 μ M di estrogeno + catalasi è risultato significativamente minore di quello registrato alla stessa concentrazione di estrogeno (rispettivamente $t=2,34$, $p=0,047$ e $t=2,33$, $p=0,04$). Questo confronto non è, invece, risultato significativo nel gruppo di individui con vitiligine non sottoposti a trattamento (POP Y: $t=1,67$, $p=0,13$) (Tab. 23, Fig. 52).

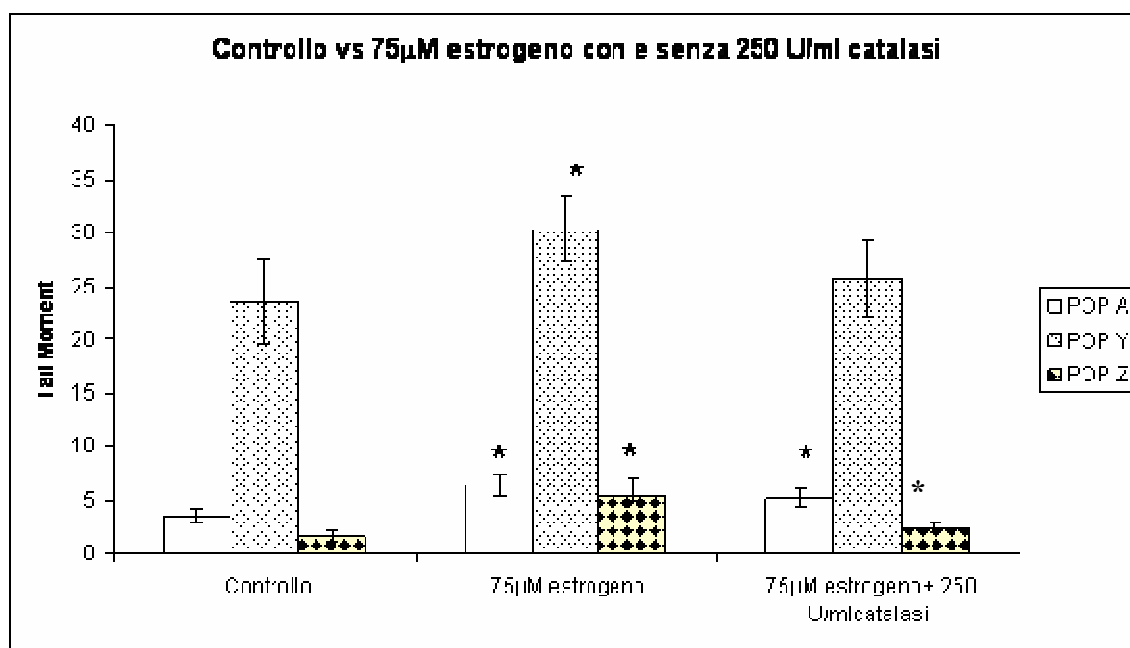


Fig. 52: Il grafico mostra l'effetto della catalasi sul danno indotto dall'estrogeno.

Fig. 52: Graph shows the effect of catalase on the damage induced by oestrogen.

Perossido di idrogeno: In POP Z e POP A il valore medio di TM alla concentrazione di 60 μ M di H_2O_2 + catalasi è risultato significativamente minore di quello registrato alla stessa concentrazione di H_2O_2 (POP Z: $t=7,63$, $p=0,0003$; POP A: $t=5,33$, $p=0,0003$) (Tab. 24, Fig. 53). In POP Y non è risultata nessuna differenza significativa per questo stesso confronto ($t=1,27$, $p=0,24$).

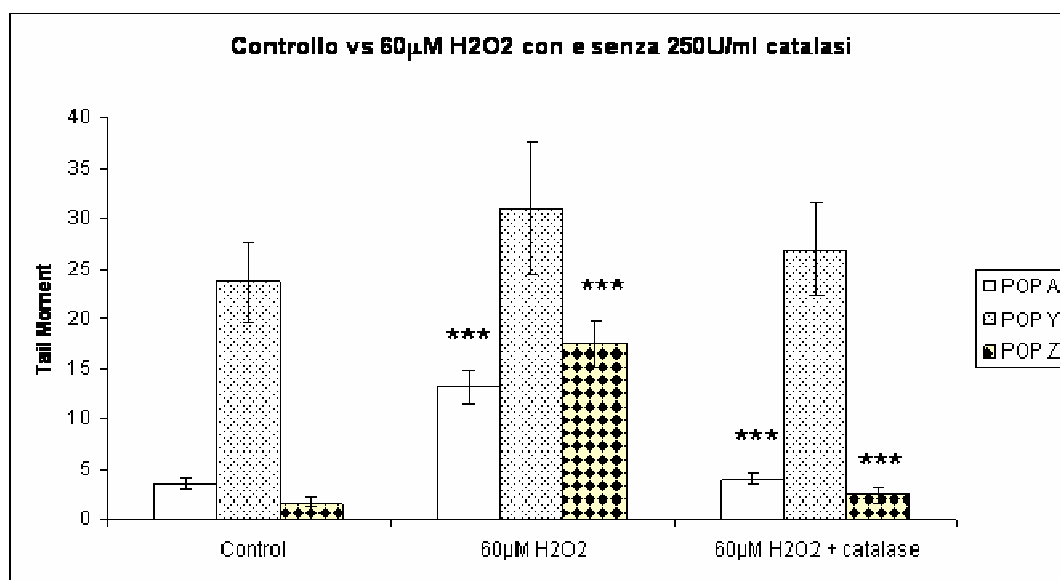


Fig. 53: Il grafico mostra l'effetto della catalasi sul danno indotto dal perossido di idrogeno.
Fig. 53: Graph shows the effect of catalase on the damage induced by hydrogen peroxide.

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,66	23,55 \pm 3,99	19,88	1,70 \pm 0,38	0,69
i 60: μ M H ₂ O ₂	13,16 \pm 1,67	8,47	31,03 \pm 6,53	27,86	17,42 \pm 2,31	11,80
j 60: μ M H ₂ O ₂ + 250 U/ml catalasi	3,98 \pm 0,56	1,90	26,78 \pm 4,65	23,11	2,44 \pm 0,72	0,68
a-i	p<0,001		n.s.		p<0,001	
i-j	p<0,001		n.s.		p<0,001	

Tab. 24: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, il valore medio \pm SE e la mediana del TM di 60 μ M di perossido di idrogeno con e senza catalasi. E' inoltre indicato il numero di individui di ogni popolazione. I confronti incrociati risultati statisticamente significativi sono riportati nella parte inferiore della tabella.

n.s.= non significativo

Tab. 24: The mean \pm SE and median value of TM of 60 μ M hydrogen peroxide alone or combined with catalase are shown for all the population. The number of individuals per each population is also reported. Statistically significant comparisons are shown at the bottom of the table.

n.s. = not significant.

	Popolazione A (N = 11)		Popolazione Y (N = 9)		Popolazione Z (N = 7)	
	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana	Media \pm S.E.	Mediana
a Controllo	5,26 \pm 0,59	1,66	23,55 \pm 3,99	19,88	1,70 \pm 0,38	0,69
e 50: μ M progesterone	6,20 \pm 0,97	2,65	28,10 \pm 4,44	28,05	5,15 \pm 0,61	1,27
f 50: μ M progesterone + 250 U/ml catalasi	5,22 \pm 0,82	2,60	24,85 \pm 2,70	22,91	3,37 \pm 1,19	0,85
g 150: μ M progesterone	7,98 \pm 0,86	4,00	29,50 \pm 4,29	27,63	5,47 \pm 2,21	1,25
h 150: μ M progesterone + 250 U/ml catalasi	7,69 \pm 0,68	3,66	26,18 \pm 3,30	23,10	3,63 \pm 0,61	1,76
	a-e	p<0,05	n.s.		p<0,001	
	e-f	n.s.	n.s.		n.s.	
	a-g	p<0,001	p<0,05		n.s.	
	g-h	n.s.	n.s.		n.s.	

Tab. 25: In tabella sono riportati, per ogni popolazione, il valore medio \pm SE e la mediana del TM di 50 e 150 μ M di progesterone con e senza catalasi. E' inoltre indicato il numero di individui di ogni popolazione. I confronti incrociati risultati statisticamente significativi sono riportati nella parte inferiore della tabella.

n.s.= non significativo

Tab. 25: The mean \pm SE and median value of TM of 50 and 150 μ M progesterone alone or combined with catalase are shown for all the population. The number of individuals per each population is also reported. Statistically significant comparisons are shown at the bottom of the table.

n.s. = not significant.

Progesterone: Nessuna differenza significativa è risultata dal confronto fra i valori medi di TM di entrambe le concentrazioni di progesterone usate sole o con catalasi (Tab. 25, Fig. 54).

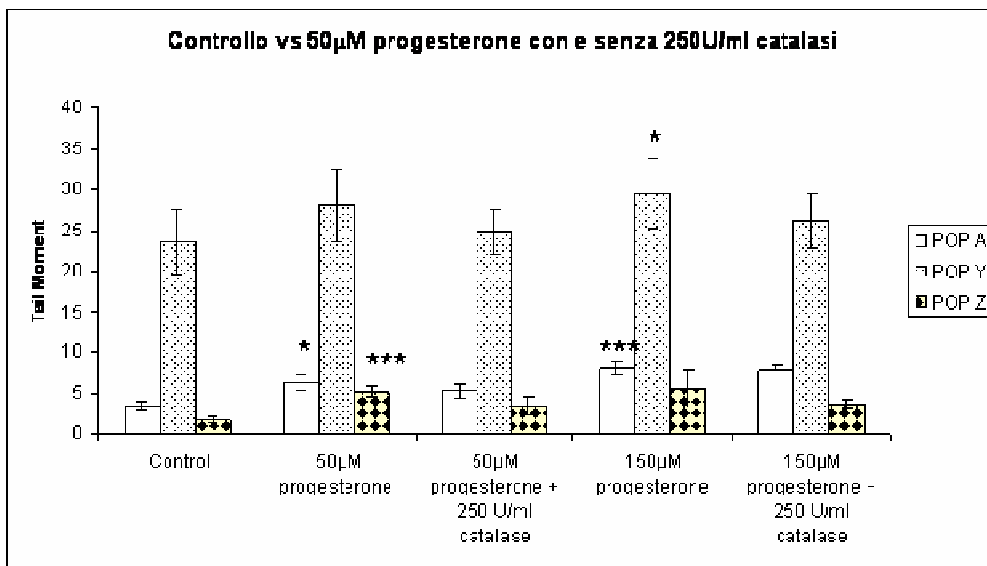


Fig. 54: Il grafico mostra l'effetto della catalasi sul danno indotto dal progesterone.
Fig. 54: Graph shows the effect of catalase on the damage induced by progesterone.

4. DISCUSSIONE

Lo studio sugli effetti delle radiazioni ha evidenziato che un'esposizione a campi magnetici di 0,65 mT (50 Hz) induce un danno al DNA, misurabile a livello di singola cellula, nel tessuto cerebrale di topi adulti. Ciò appare evidente confrontando i valori medi del Tail Moment e della percentuale di DNA nella coda delle comete del gruppo controllo e del gruppo esposto. I risultati ottenuti, considerando la totalità delle cellule analizzate per ogni individuo, confermano e rafforzano tale dato. Infatti, in questo caso, in tutti e tre i parametri (TM, %DNA e TL) si registra un incremento nel livello di danno dopo l'esposizione. Similmente, nelle cellule di cervello di topi neonati la risposta alle radiazioni dà come chiaro risultato un aumento del danno al DNA. Questa risposta positiva, evidenziata dall'analisi dei valori medi dei tre parametri per ogni gruppo, viene confermata quando si analizzano i dati considerando la totalità delle cellule esaminate. Inoltre, sia nei neonati che negli adulti del gruppo controllo, è stata osservata una percentuale di cellule con valore dei parametri pari a zero, ovvero nuclei interi non danneggiati, significativamente maggiore che negli animali esposti.

Questi risultati sono in accordo con precedenti ricerche, prima fra tutte quella di Lai & Singh (1997) i quali hanno rilevato un danno al DNA del cervello di ratti adulti sottoposti, *in vivo*, a diverse dosi acute di radiazione non ionizzante (0,1, 0,25 e 0,5 mT; 60 Hz) per due ore. Un incremento delle rotture al singolo filamento del DNA si manifestava già dopo l'esposizione alle intensità più basse (0,1 mT). L'ammontare del danno, poi, aumentava con l'aumentare delle dosi. L'esposizione a 0,25 mT e 0,5 mT causava, inoltre, un aumento di rotture al doppio filamento.

Un incremento del danno al DNA in cellule di cervello di topi CBA è stato osservato anche da Svedenstal *et al.* (1999a). Gli autori notarono che gli animali esposti per 14 giorni a campi magnetici di 0,5 mT, mostravano un'induzione significativa del danno. In un altro esperimento, gli animali venivano, invece, esposti in ambiente naturale, come indicatori di 2° tipo, per tempi diversi (11, 20 e 32 giorni) a campi di 7,5 μ T prodotti da una linea di trasmissione elettrica. Gli animali erano disposti in gabbie protette dagli agenti esterni da una struttura in legno. Anche in questo caso il danno al DNA delle cellule del cervello è stato rilevato negli animali esposti più a lungo (32 giorni) (Svedenstal *et al.*, 1999b).

Al contrario McNamee *et al.* (2002) in topi immaturi hanno osservato assenza di danno al DNA, sempre in cellule di cervello, dopo una singola esposizione di 2 h a campi magnetici di 60 Hz ed 1 mT.

Benché un confronto diretto fra questi risultati sia difficile a causa delle differenze nelle intensità testate e nei tempi di esposizione, sembra emergere l'importanza di quest'ultimo fattore. La possibilità di un accumulo del danno al DNA con il prolungarsi dell'esposizione non va

sottovalutata soprattutto in considerazione del fatto che il danno al DNA o una deficienza nei meccanismi di riparazione possono rappresentare un primo passo verso la trasformazione tumorale della cellula.

Nella presente ricerca un aumento del danno al DNA in cellule di cervello di topi di laboratorio indotto da un'esposizione a campi magnetici di 50 Hz e 0,65 mT è stato riscontrato non solo in seguito ad una esposizione di individui adulti per un periodo di 22-23 giorni, ma anche nel cervello di neonati esposti durante tutto il periodo di gestazione fino a tre giorni dopo la nascita.

Il livello basale di rotture al DNA del cervello dei topi adulti è risultato più elevato che nei neonati. Questa differenza potrebbe essere spiegata, almeno in parte, da una maggiore complessità del tessuto cerebrale degli adulti e dalla differenza di età.

Sono infatti riportati in letteratura dati che mettono in evidenza un accumulo di danno ossidativo, nel DNA dipendente dall'età. Il livello basale di rotture al singolo filamento (Chetsanga *et al.*, 1977) così come al doppio (Hartnell *et al.*, 1989) nel cervello e nel fegato è risultato maggiore in ratti adulti che in giovani. Più recentemente Akcha *et al.* (2004) hanno riscontrato, con il *Comet assay*, un livello più alto di rotture al DNA in eritrociti ed epatociti di esemplari adulti del pleuronettide *Limanda limanda* rispetto a quello misurato negli individui più giovani. Anche Giovannelli *et al.* (2003) riscontrano, con il *Comet assay*, un livello basale di danno al DNA maggiore nella *substantia nigra* di ratti di ventiquattro mesi che in quelli di tre.

Comunque, il dato, a mio avviso, più importante è quello che emerge dal confronto dell'incremento del danno negli animali adulti e nei neonati. Infatti dai risultati ottenuti nel presente lavoro emerge chiaramente, tenuto conto sia dei dati del cervello che di quelli del sangue, la maggiore sensibilità dei neonati alle radiazioni.

Se si prende in considerazione il TM come parametro riassuntivo, questo, dopo l'esposizione, aumenta di cinque volte nel cervello dei neonati mentre raddoppia soltanto negli adulti. Anche nel sangue il valore di TM aumenta quattro volte nei neonati e nemmeno raddoppia negli adulti.

Questo dato conferma quanto già affermato da Bergonie e Tribondeau (1906) sulla radiosensibilità dei tessuti, la quale è inversamente proporzionale alla differenziazione cellulare e direttamente proporzionale all'attività cariocinetica. Quindi ne consegue che un tessuto poco differenziato ed in attiva proliferazione cellulare, come è quello di un individuo neonato, sia più sensibile alle radiazioni.

Analizzando i dati ottenuti nel sangue, oltre alla maggiore sensibilità dei neonati, si osserva che i valori medi di Tail Moment, % di DNA nella coda e Tail Length risultano sempre più elevati nel gruppo di controllo. In particolare, questa differenza è significativa quando si analizzano i valori della totalità delle cellule contate nel sangue dei topi adulti.

Negli animali esposti è anche presente una percentuale di cellule non danneggiate (valore dei parametri misurati pari a zero) significativamente maggiore rispetto ai gruppi di controllo. E' riportato, in letteratura, che un valore di danno minore nel gruppo esposto rispetto al controllo può indicare, nel test del *Comet assay*, la presenza di *crosslinks* nel DNA delle cellule analizzate. I *crosslinks* possono essere conseguenza di errori durante la replicazione del DNA. Si possono avere all'interno della stessa molecola di DNA (*inter-strand crosslinks*) e fra DNA e proteine (*crosslinks DNA-proteina*). I primi consistono nel legame di una base ad entrambi i filamenti del DNA e si possono formare per azione di agenti alchilanti, raggi UV e radiazioni ionizzanti. I *crosslinks* DNA-proteina, invece, sono generalmente formati dalle topoisomerasi che instaurano legami di tipo covalente con il DNA durante la loro azione catalitica. Normalmente questi legami sono temporanei e vengono sciolti non appena la topoisomerasi termina il suo lavoro. Questo legame può diventare stabile quando alcune condizioni interferiscono con la normale replicazione del DNA. Agenti alchilanti e radiazioni possono mimare queste interazioni e formare legami crociati con il DNA.

Nel *Comet assay*, elettroforesi su singola cellula, il DNA, carico negativamente, migra verso l'anodo durante la corsa elettroforetica. Al contrario, la maggioranza delle proteine che si legano al DNA per formare *crosslinks* sono cariche positivamente e migrano nel verso opposto (catodo). E' stato dimostrato che la proteinasi K, liberando i filamenti del DNA dalle proteine, è in grado di migliorare la risposta, nel *Comet assay*, di cellule in cui siano stati indotti legami crociati rivelando la presenza dei *crosslinks*. Il trattamento con proteinasi K di sospensioni di sangue da individui esposti a radiazioni elettromagnetiche può fornire una più chiara quantificazione del danno indotto da questo tipo di agente. E' interessante notare come nel gruppo di animali esposto il livello di danno dopo trattamento con proteinasi K sia senz'altro superiore a quello ottenuto in una sospensione non trattata con questo enzima. Quindi i risultati ottenuti sembrano essere a favore della presenza di *crosslinks* nel sangue dopo l'esposizione di adulti e neonati ai campi magnetici.

La formazione di *crosslinks* era già stata documentata da Lai & Singh (1997) su cellule cerebrali di ratti esposti, *in vivo*, per 2 ore a campi di 0,5 mT (60 Hz). Più recentemente Stronati *et al.* (2004) hanno analizzato il danno al DNA in sangue umano esposto *in vitro* a campi magnetici (50 Hz, 1 mT). Ma i risultati ottenuti con una batteria di test per la genotossicità, fra i quali il *Comet assay*, le aberrazioni cromosomiche, il test dei micronuclei e l'analisi degli scambi fra cromatidi fratelli, hanno evidenziato un'assenza di danno e nessuna presenza di *crosslinks* nel sangue. In accordo con Stronati sono anche i risultati di Scarfi *et al.* (1999) e Abramsson-Zetterberg & Grawè (2001) che rilevano come un'esposizione a campi magnetici di 50 Hz non induca un incremento della frequenza di micronuclei rispettivamente in linfociti umani esposti

per 72 h ed eritrociti di topo esposti per 18 giorni (14 μ T). Questi risultati non sono facilmente confrontabili fra loro. Infatti Stronati *et al.* (2004) e Scarfi *et al.* (1999) riportano dati di brevi esposizioni *in vitro*, mentre Lai & Singh (1997) e Abramsson-Zetterberg & Grawè (2001) riportano dati *in vivo*. Nei due studi *in vivo*, inoltre, i tempi e le condizioni di esposizione sono molto diversi; anche i test utilizzati nelle analisi sono distinti. Il *Comet assay* rivela, infatti, un danno a breve termine dall'esposizione, mentre il test dei micronuclei e l'analisi delle aberrazioni cromosomiche evidenziano un danno ormai fisso nel genoma. E' quindi difficile trarre delle conclusioni riassuntive dal confronto di questi dati fra di loro e con quelli ottenuti nella presente ricerca.

Anche nei neonati i valori medi di TM, %DNA e TL, osservati nel sangue, sono significativamente più elevati negli individui controllo rispetto a quelli misurati negli individui esposti. Questa differenza risultava minore nell'analisi condotta non sugli individui ma sul totale delle cellule analizzate. Ciò è da attribuire alla grande variabilità riscontrata nelle cellule degli individui controllo. Va comunque sottolineato che il danno rilevato nel sangue, sia negli adulti che nei neonati, non è elevato e che nelle distribuzioni relative sono prevalentemente presenti cellule non danneggiate. Pertanto, in base ai risultati ottenuti, la presenza di *crosslinks* nel sangue degli adulti e dei neonati può essere ipotizzata, ma non considerata certa.

E' generalmente accettato che il danno indotto al DNA dalle radiazioni magnetiche sia di tipo secondario, infatti la loro energia non è tale da giustificare un'interazione diretta con la molecola di DNA. A questo riguardo merita particolare attenzione un recente studio di Lai & Singh (2004) condotto su ratti Sprague Dawely esposti per 24 e 48 h a campi magnetici di 0,01 mT (60 Hz). Il disegno sperimentale prevedeva, prima e dopo l'esposizione, un trattamento con un potente "scavenger" (Trolox), un inibitore della sintesi dell'ossido di azoto (7-nitroindazolo) e una sostanza chelante del ferro (deferiprone). L'incremento del danno al DNA registrato nel cervello degli animali esposti era sempre inibito dalle tre sostanze utilizzate. Ciò ha portato gli autori a ritenere che lo ione Fe^{2+} potesse avere un ruolo importante nel meccanismo d'azione dei campi magnetici. La loro teoria si basa sul ruolo catalizzatore che lo ione Fe^{2+} svolge nella reazione di Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot}$) che porta alla formazione del radicale OH^{\cdot} . L'esposizione a campi magnetici disturberebbe l'omeostasi del ferro producendo un incremento della sua concentrazione nel citoplasma e nel nucleo delle cellule. Una concentrazione elevata di Fe^{2+} favorirebbe la formazione di radicali liberi attraverso la reazione di Fenton. I radicali liberi, a loro volta, danneggerebbero lipidi, proteine e DNA. Il danno ai lipidi porterebbe poi ad un rilascio di ioni Ca^{2+} dai siti di stoccaggio interni alla cellula con un conseguente aumento della sintesi dell'ossido di azoto attraverso l'attivazione, calmodulina dipendente, della sua sintesi. In ultima analisi il danno al DNA e ad altre macromolecole sarebbe causato principalmente

dall'ossido di azoto stesso. Il radicale idrossilico, infatti, ha un raggio di azione piuttosto ridotto (circa 40Å), mentre l'ossido nitrico può diffondere anche a distanze dell'ordine di qualche diametro cellulare e potrebbe quindi danneggiare anche cellule vicine non direttamente colpite dalle radiazioni.

Nel plasma sono presenti molecole di piccolo e alto peso molecolare molto attive in ambienti redox, in grado di reagire rapidamente con radicali liberi di tipo organico ed inorganico (Gutteridge & Quinlan 1993) e, per questo motivo, considerate importanti antiossidanti. La proprietà antiossidante del plasma è legata principalmente a due proteine che rappresentano appena il 4% di quelle presenti: la transferrina, un potente chelante del ferro, e la ceruloplasmina, un suo ossidante. In particolare, quest'ultima, catalizzando l'ossidazione dello ione ferrico (Fe^{2+}) a ferroso (Fe^{3+}) (attività ferrosidasica) può inibire la perossidazione dei lipidi e la reazione di Fenton (Gutteridge 1985).

Se l'ipotesi di Lai & Singh (2004) fosse vera, sarebbe lecito aspettarsi che l'effetto dei campi magnetici sul sangue sia meno forte che in altri tessuti. La sua capacità "tamponante" gli offrirebbe una considerevole protezione contro le specie reattive dell'ossigeno generate dall'esposizione alle radiazioni. Non deve quindi sorprendere più di tanto che la risposta ottenuta sul sangue, in questo studio, non risulti di facile interpretazione.

Il coinvolgimento dei radicali liberi nel meccanismo d'azione delle radiazioni elettromagnetiche a bassa frequenza è stato ipotizzato anche da altri autori (Grundler *et al.*, 1992; Fiorani *et al.*, 1997; Eveson *et al.*, 2000; Jajte *et al.*, 2002) e risulta di particolare importanza. I radicali liberi, infatti, non hanno effetto solo sulla molecola del DNA ma possono danneggiare lipidi e proteine alterando la normale omeostasi cellulare. E' inoltre riportato in letteratura che lo stress ossidativo è coinvolto nell'invecchiamento cellulare e in malattie neurodegenerative come il Parkinson (Mullaart *et al.*, 1990; Giovannelli *et al.*, 2003). Inoltre la presenza di bassi livelli di catalasi nell'epidermide e nei linfociti di persone affette da vitiligine ha fatto supporre un coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) anche in questa malattia. E' stato suggerito che alcuni ormoni, come gli estrogeni, possano essere coinvolti nel processo di depigmentazione che caratterizza questo disturbo. I risultati ottenuti nello studio effettuato su linfociti umani di pazienti affetti da vitiligine e di individui sani mostra che la concentrazione di 75 μM di estrogeno causa un aumento di danno al DNA in entrambi i gruppi di cellule e che l'aggiunta di catalasi annulla solo il danno indotto negli individui sani. Ciò può far supporre un coinvolgimento diretto degli estrogeni nel danno indotto al DNA negli individui affetti da vitiligine. Questo dato assume importanza soprattutto alla luce del fatto che la degradazione degli estrogeni da parte del citocromo p450 porta alla produzione di H_2O_2 e, *in vitro*, contribuisce in maniera significativa al danno al DNA in linfociti e spermatozoi (Anderson *et al.*,

2003). Quindi gli estrogeni potrebbero essere responsabili del danno ossidativo registrato nei pazienti con vitiligine contribuendo alla formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Nello studio sugli effetti dei campi magnetici, gli animali sono stati sacrificati subito dopo l'esposizione. Il danno che è stato rilevato è quindi un danno a breve termine. Il danno al DNA è in genere riparato rapidamente, da qualche minuto a poche ore, attraverso i normali meccanismi cellulari di riparazione. Le rotture al singolo filamento in particolar modo possono essere facilmente riparate.

Relativamente ai dati ottenuti nel presente lavoro sarebbe quindi azzardato trarre conclusioni certe sulle conseguenze per la cellula del danno registrato. Questi dati infatti, devono essere considerati preliminari e inseriti all'interno di un progetto più ampio dal titolo "Sorveglianza ambientale di popolazioni naturali di piccoli mammiferi, roditori ed insettivori, esposti a campi elettromagnetici locali" (Referente I.S.P.E.S.L.: Dr. L. Giuliani; Referente Uniroma1: Prof. M. Cristaldi) che si propone di indagare gli eventuali effetti biologici dell'esposizione a campi elettromagnetici utilizzando, come modello sperimentale, i Roditori, animali ampiamente studiati in laboratorio e ritenuti da tempo organismi particolarmente idonei per gli studi di impatto ambientale (Cristaldi *et al.*, 1985; Cristaldi 1989; Ieradi & Cristaldi 1996; Ieradi *et al.*, 1996). In questo contesto i risultati ottenuti potranno essere meglio valutati attraverso il confronto con i risultati di altre analisi previste nel progetto. In particolare l'analisi dei micronuclei sul midollo osseo degli adulti e sul fegato dei neonati, oltre che sul sangue di entrambi, indicherà se il danno, registrato con il *Comet assay* al termine dell'esposizione, viene riparato. Mentre l'analisi delle anomalie spermatiche e delle gonadi daranno informazioni su un possibile danno genotossico nella linea germinale e su eventuali alterazioni della fertilità (Cristaldi *et al.*, 1990).

La necessità di comparare gli effetti indotti in diversi organi è realizzabile al meglio *in vivo*, ossia nell'ambito di uno stesso organismo pluricellulare differenziato, nel quale esistono popolazioni cellulari interdipendenti dal punto di vista genetico e metabolico. In laboratorio è preferibile eliminare la variabilità biologica utilizzando ceppi *imbred*, una volta che si sia a conoscenza dei particolari effetti ottenuti *in vitro* con linee monocellulari, abitualmente utilizzate in alternativa agli studi *in vivo*, ma effettivamente complementari ad essi. L'efficacia di questa complementarità diventa sempre più evidente con l'aumentare degli studi condotti *in vivo* come quello eseguito per la presente tesi. In laboratorio l'uso di diverse specie è necessario per determinare comparativamente le varianti che caratterizzano la specifica suscettibilità di un ceppo o di una specie. Ad esempio, per il problema della suscettibilità ai campi magnetici, nel presente studio è stato utilizzato il ceppo *Swiss* di topolini albini, mentre esistono in letteratura studi di questo tipo nei quali sono stati utilizzati ratti di ceppo *Wistar* o di altri ceppi murini (Svedenstal *et al.*, 1999a, 1999b). Le differenti dimensioni tra i due Roditori Murini potrebbero

costituire un interessante parametro di confronto soprattutto nel caso di esposizione a campi elettrici. Invece nel caso di esposizione a campi magnetici le caratteristiche fisiche sembrerebbero non assumere importanza mentre, dai dati ottenuti, sembrano rivestire un ruolo significativo alcuni aspetti biologici quali il tipo di tessuto o l'età.

Una volta che i diversi tipi di biomarcatori (biochimici, genetici, morfologici) siano stati convalidati in laboratorio per l'esposizione a campi magnetici (anche ad intensità più basse rispetto a quella usata in questo studio) sarà interessante studiare la risposta in natura di ceppi esposti sul campo in qualità di bioindicatori di 2° tipo e delle popolazioni naturali, a questo tipo di contaminazione. In effetti, tale tipo di analisi presenta diversi vantaggi rispetto ai test simulati in condizioni di laboratorio e/o rispetto alla sorveglianza epidemiologica, spesso limitata alle popolazioni umane. Il principale vantaggio è quello di osservare in un intero organismo bioindicatore, in prima istanza scelto in base al modello mammaliano, un complesso di "memorie" di effetti e di meccanismi di riparo e difesa filtrati dalla selezione naturale. Infatti, nel caso dell'azione dei campi elettromagnetici, le condizioni di esposizione in natura sono soggette ad una maggiore eterogeneità della qualità e quantità dell'irradiazione; inoltre la fonte di contaminazione può essere interrotta, o eliminando l'apporto della fonte di campo, ovvero spostandosi dal suo spazio di azione. Tuttavia, in condizioni di esposizione ambientale, lo stimolo del campo elettromagnetico può protrarsi con continuità e nel corso delle successive generazioni, avvicinando in termini probabilistici e di contiguità spaziale le modalità di esposizione dei bioindicatori in natura a quelle delle popolazioni umane. Questo tipo di studio potrà quindi fornire indicazioni utili ad estrapolare alla popolazione umana gli eventuali effetti dell'esposizione.

5. CONCLUSIONI

Questo studio fornisce un'ulteriore prova di un effetto dannoso dei campi magnetici a 50 Hz e 0,65 mT in cellule del cervello di topi adulti e neonati. Emerge anche che la risposta all'esposizione a campi magnetici può essere diversa per classi di individui o apparati biologici; la risposta ottenuta è stata infatti età-specifica e tessuto-specifica. I neonati sono risultati più sensibili degli adulti alle radiazioni magnetiche e confrontando i due tessuti utilizzati si è potuto notare come la risposta nel tessuto nervoso sia stata più intensa che nel sangue. Questi risultati richiedono comunque ulteriori conferme. Sarebbe auspicabile approfondire le conseguenze dell'esposizione anche su altri organi bersaglio, in modo da poter fornire uno spettro più ampio possibile di informazioni utili alla salvaguardia delle popolazioni umane. A questo scopo sarebbe anche interessante riuscire a standardizzare, fra i diversi istituti e laboratori che in tutto il mondo si occupano di radiazioni non ionizzanti, dei parametri utili per un confronto dei diversi risultati ottenuti, ad esempio nelle unità di misura in cui vengono indicate le esposizioni (SAR, V/m, T etc.). Questo renderebbe forse più facile individuare le migliori linee di ricerca da seguire. Se si riuscisse in questo intento sarebbe possibile spostare l'attenzione anche su studi in natura. Infatti, escludendo gli studi di epidemiologia umana, i dati in ambiente naturale sono scarsissimi o nulli (Svedenstal *et al.* 1999a; 1999b), anche perché, almeno a mio avviso, in carenza di uno standard espositivo in laboratorio, manca ancora per gli studi di biomonitoraggio un termine di paragone certo al quale far riferimento.

Attualmente è raccomandabile un comportamento di cautela finalizzato a ridurre quanto più possibile i livelli espositivi. La legge italiana accoglie questa preoccupazione e fissa un limite di 100 μ T per i campi magnetici di 50 Hz. Sembra anche recepire le indicazioni provenienti dalla ricerca riducendo, nella progettazione di nuovi impianti e insediamenti in loro prossimità, questo limite a 3 μ T che però è ancora un valore superiore a quello indicato dalle ricerche scientifiche (0,2 μ T).

Viene infine confermata la capacità e la sensibilità del *Comet assay* nel rilevare un danno genotossico nel DNA delle singole cellule indotto da stress ossidativo possibilmente causato dalla formazione di specie reattive dell'ossigeno.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abramsson-Zetterberg L., Grawè J. (2001) Extended exposure of adult and fetal mice to 50 Hz magnetic field does not increase the incidence of micronuclei in erythrocytes. *Bioelectromagnetics* 22, 351-357
- Ahlbom A. (1997) Residential epidemiological studies. In: *Biological effects of static and ELF electric and magnetic fields*. (eds Matthes R., Berhrdt JH. & Repacholi MH.), pp. 185-190. ICNRP Publication 4, Oberschleissheim, Germany
- Ahlbom A., Cardis E., Green A., Linet M., Savitz DA., Swerdlow A. (2001) Review of epidemiological literature on EMF and health. *Environmental Health Perspectives* 109, 911-933
- Ahlbom A., Day N., Feychting M., Roman E., Skinner J., Dockerty J., Linet M., McBride M., Michaelis J., Olsen JH., Tynes T. & Verkasalo PK. (2000) A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *British Journal of Cancer* 83, 692-698
- Akcha F., Leday G., Pfohl-Leszkowicz A. (2004) Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research* 552, 197-207
- Alapetite C., Benoit A., Moustacchi E. & Sarasin A. (1997) The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of Xeroderma pigmentosus and trichothiodystrophy. *Journal of Investigative Dermatology* 108, 154-159
- Albertini RJ., Anderson D., Douglas GR., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan AT., Norppa H., Shuker DEG., Tice R., Waters MD. & Aitio A. (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463, 111-172
- Anderson D., Schmid TE., Baumgartner A., Cemeli-Carratala E., Brinkworth MH., Wood JM. (2003) Oestrogenic compounds and oxidative stress in human sperm and lymphocytes in the Comet assay. *Mutation Research* 544, 173-178
- Anderson D., Yu TW., McGregorDB. (1998) Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis* 13, 539-555
- Andrews PW., Tice RR., Nauman CH. (1990) *In vitro* DNA damage in peripheral blood leukocytes as measured by the single cell gel (SCG) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15, 6
- Arabi M. (2004) Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia* 36, 305-310
- Arlett CF., Lowe JE., Harcourt SA., Waugh AP, Cole J., Roza L., Diffey BL., Mori T., Nikaido O., Green MH. (1993) Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation. *Cancer Research* 53, 609-614
- Auerbach C. & Robson JM. (1947) The production of mutations by chemical substances. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B* 62, 271-283
- Auerbach C. (1951) Induction of changes in genes and chromosomes. *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology*
- Baskin SI. & Salem I. (1997) *Oxidants, antioxidants and free radicals*. London, Washington, DC.
- Beazley WD., Gaze D., Panske A., Panzig E., Schallreuter KU. (1999) Serum selenium levels and blood glutathione peroxidase activities in vitiligo. *British Journal of Dermatology* 141, 301-303

- Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch-Volders M. (1998) Development and validation of the *in vivo* alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research* 415, 167-184
- Bergonie J., & Tribondeau L. (1906) Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 76(4), 181-2
- Betti C., Barale R., Pool-Zobel BL. (1993) Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 22, 172-180
- Bistolfi F. (1986) Inquadramento generale dell'interazione fra campi magnetici e materia vivente. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica, Torino), II edn, pp. 249-263.
- Blackman CF. (1986) The biological influences of low-frequency sinusoidal electromagnetic signals alone and superimposed on RF carrier waves. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica, Torino), II edn.
- Blank M. (1992) Na,K-ATPase function in alternating electric fields. *FASEB Journal* 6, 2434-2438
- Blank M. (1995) Biological effects of environmental electromagnetic fields: molecular mechanisms. *BioSystems* 35, 175-178
- Blank M. & Soo L. (1989) The effects of alternating currents on Na,K-ATPase function. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 22, 313-322
- Blank M. & Soo L. (1992) The threshold for alternating current inhibition of the Na,K-ATPase. *Bioelectromagnetics* 13, 329-333
- Blank M. & Soo L. (1993) The Na,K-ATPase as a model for electromagnetic field effects on cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 30, 85-92
- Blank M. & Soo L. (1997) Frequency dependence of Na,K-ATPase function in magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42, 231-234
- Blasiak J., Arabski M., Krupa R., Wozniak K., Zadrozny M., Kasznicki J., Zurawska M., Drzewoski J. (2004) DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research* 554, 297-304
- Boland A., Delapierre D., Mossay D., Dresse A., Seutin V. (2002) Effect of intermittent and continuous exposure to electromagnetic fields on cultured Hippocampal cells. *Bioelectromagnetics* 23, 97-105
- Bolognesi C., Buschini A., Branchi E., Carboni P., Furlini M., Martino A., Monteverde M., Poli P., Rossi C. (2004) Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the total Environment* 333, 137-136
- Cadet J. & Berger M. (1985) Radiation-induced decomposition of the purine bases within DNA and related model compounds. *International Journal of Radiation Biology* 47, 127-143
- Campbell-Beachler M., Ishida-Jones T., Haggren W., Phillips JL. (1998) Effect of 60 Hz magnetic field exposure on *c-fos* expression in stimulated PC12 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 189, 107-111
- Cañedo L., Garcia Cantù R., Hernandez-R.J. (2003) Magnetic field exposure during gestation: pineal and cerebral cortex serotonin in the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience* 21, 263-266

- Cecconi S., Gualtieri G., Di Bartolomeo A., Troiani G., Cifone MG., Canipari R. (2000) Evaluation of the effects of extremely low frequency electromagnetic fields on mammalian follicle development. *Human Reproduction* 15, 2319-2325
- Cerda H., Delincee H., Haine H., Rupp H. (1997) The DNA "comet assay" as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Research* 375, 167-181
- Chance WT., Grossman CJ., Newrock R., Bovin G., Yerian S., Schmitt G., Mendenhall C. (1995) Effects of electromagnetic fields and gender on neurotransmitters and aminoacids in rats. *Physiological Behaviour* 58, 743-748
- Chen G., Cai G., Zhang R., Tu P., Zhao N. (1998) Effects of the weak alternating electric field on Na⁺ concentration inside human red blood cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45, 127-130
- Chenn A., Zhang YA., Chang BT., McConnell SK. (1998) Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Molecular Cell Neuroscience* 11, 183-193
- Chetsanga CJ., Tuttle M., Jacobini A., Johnson C. (1977) Age-associated structural alteration in senescent mouse brain DNA. *Biochimica and Biophysica Acta* 474, 180-187
- Chiabrera A., Bianco B., Caratozzolo F., Gianetti G., Grattarola M., Viviani R. (1986) Electric and magnetic field effects on ligand binding to cell membrane. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica, Torino), II edn.
- Chou CK. & D'Andrea JA. (2003) Review of effects of RF fields on various aspects of human health: introduction. *Bioelectromagnetics Supplement* 6, S5-S6
- Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte JD. (2001) Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research* 478, 89-96
- Collins AR., Dusinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayotidis M., Raslova K., Vaughan N. (1997) Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30, 139-146
- Collins AR., Dusinska M., Gedik CM., Stetina R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 104, 465-469
- Collins AR., Duthie SJ., Dobson VL. (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735
- Cook PR. & Brazell IA. (1978) Spectrofluorometric measurement of the binding of ethidium to superhelical DNA from cell nuclei. *European Journal of Biochemistry* 84, 465-477
- Cotelle S. & Ferard JF. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Mutagenesis* 34, 246-255
- Coulton LA., Barker AT., Van Lierop JE., Walsh MP. (2000) The effect of static magnetic fields on the rate of calcium/calmodulin-dependent phosphorylation of myosin light chain. *Bioelectromagnetics* 21, 189-196
- Cristaldi M. (1989) Metodologie, esempi e prospettive per l'uso dei Roditori come indicatori biologici nell'area di Roma. Seminario di studio e analisi. 12-14. Le ricerche della facoltà di Scienze M. F. N. dell'Università "La Sapienza" per i problemi ambientali della città. 23-6-1989.
- Cristaldi M., D'Arcangelo E., Ieradi LA., Mascanzoni D., Mattei T., Van Axel Castelli I. (1990) 137Cs determination and mutagenicity tests in wild *Mus musculus domesticus* before and after the Chernobyl accident. *Environmental Pollution* 64, 1-9

- Cristaldi M., Ieradi LA., Licastro E., Lombardi Boccia G., Simeone G. (1985) Environmental impact of nuclear power plants on wild rodents. *Acta Zoologica Fennica* 173, 205-207
- Croom DK., Andrews PW., Nascimbeni B., Tice RR. (1991) Evaluation of chemically induced DNA damage in germ cell of male mice using the single cell gel (SCG) electrophoresis assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 17, 19
- D'Andrea JA., Chou CK., Johnston SA., Adair ER. (2003) Microwave effects on the nervous system. *Bioelectromagnetics Supplement* 6, S107-S147
- Davidson JF., Guo HH., Loeb LA. (2002) Endogenous mutagenesis and cancer. *Mutation Research* 509, 17-21
- Deeley JOT. & Moore JL. (1992) Single-cell microgel electrophoresis: an *in vitro* assay of radiosensitivity. *British Journal of Radiology* 24, 65-69
- Del Seppia C., Mezzasalma L., Choleris E., Luschi P., Ghione S. (2003) Effects of magnetic field exposure on open field behaviour and nociceptive responses in mice. *Behavioural Brain Research* 144, 1-9
- Delfino G., Lanciotti E., Liguri G., Stefani M. (1995) Biologia e Medicina. In: *Dizionario Enciclopedico di Scienze Biologiche e Mediche* Zanichelli Editore S.p.A..
- Ding GR., Nakahara T., Tian F., Guo Y., Miyakoshi J. (2001) Transient suppression of X-ray-induced apoptosis by exposure to power frequency magnetic fields in MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286, 953-957
- Diniz P., Soejima K., Ito G. (2002) Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 7, 18-23
- Duez P., Dehon G., Kumps A., Dubois J. (2003) Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18, 159-166
- Dusinska M., Collins A., Kazimirová A., Barancoková M., Harrington V., Volkovová K., Staruchová M., Horská A., Wsolová L., Kocan A., Petrik J., Machata M., Ratcliffe B., Kyrtopoulos S. (2004) Genotoxic effects of asbestos in humans. *Mutation Research* 553, 91-102
- Evans MD., Podmore ID., Daly GJ., Perrett D, Lunec J., Herbert KE. (1995) Detection of purine lesions in cellular DNA using single cell gel electrophoresis with Fpg protein. *Biochemical Society Transactions* 23, 434S
- Eveson RW., Timmel CR., Broklehurst B., More PJ., McLauchlan KA. (2000) The effects of weak magnetic fields on radical recombination reactants in micelles. *International Journal of Radiation Biology* 76, 1509-1522
- Fairbairn DW., Olive PL., O'Neill KL. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 37-59
- Fairbairn DW., O'Neill KL., Standing MD. (1993) Application of confocal laser scanning microscopy to analysis of H₂O₂-induced DNA damage in human cells. *Scanning* 15, 136-139
- Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker RH., Mann M., Mersch-Sundermann V. (2004) The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research* 566, 209-229
- Festa F., Cristaldi M., Ieradi LA., Moreno S., Cozzi R. (2003) The Comet assay for the detection of DNA damage in *Mus spretus* from Donana National Park. *Environmental Research* 91, 54-61

- Fesus L., Davies PJ., Piacentini M. (2004) Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *European Journal of Cell Biology* 56, 170-177
- Feychting M. & Ahlbom A. (1993) Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines. *American Journal of Epidemiology* 138, 467-481
- Fiorani M., Biagiarelli B., Vetrano F., Guidi G., Dacha M., Stocchi V. (1997) In vitro effects of 50 Hz magnetic fields on oxidatively damaged rabbit red blood cells. *Bioelectromagnetics* 18, 125-131
- Friend JH., Carpenter TD., & Tice RR. (1993) Evaluation of chemically-induced DNA damage in germinal tissue of female mice using the single cell gel (SCG) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 21, 20
- Frölen H., Svedenstal BM., Paulsson LE. (1993) Effects of pulsed magnetic fields on the developing mouse embryo. *Bioelectromagnetics* 14, 197-204
- Fulton JP., Cobb S., Preble L., Leone L., Forman E. (1980) Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode Island. *American Journal of Epidemiology* 111, 292-296
- Gedik CM., Ewen SW., Collins AR. (1992) Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International Journal of Radiation Biology* 62, 313-320
- Gedik CM., Wood SG., Collins AR. (1998) Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the Comet assay compared. *Free Radicals Research* 29, 609-615
- Giovannelli L., Decorosi F., Dolara P., Pulvirenti L. (2003) Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Research* 969, 244-247
- Goodman R. & Henderson AS. (1988) Exposure of salivary gland cells to low frequency electromagnetic fields alters polypeptide synthesis. *Proceeding National Academy of Sciences* 85, 3928-3932
- Grandolfo M., Michaelson SM., Rindi A. (1983) *Biological effects and dosimetry of nonionizing radiation radiofrequency and microwave energies*. Plenum Press NY and London.
- Green MH., Lowe JE., Harcourt SA., Akinluyi P., Rowe T., Cole J., Anstey AV., Arlett CF. (1992) UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and Xeroderma pigmentosus donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutation Research* 273, 137-144
- Green MH., Lowe JE., Waugh AP., Aldridge KE., Cole J., Arlett CF. (1994) Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutation Research* 316, 91-102
- Greenland S., Sheppard AR., Kaune WT., Poole C., Kelsh MA. (2000) A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. Childhood Leukemia-EMF Study Group. *Epidemiology* 11, 624-634
- Grimaldi S., Pasquali E., Barbatano L., Lisi A., Santoro N., Serafino A., Pozzi D. (1997) Exposure to a 50 Hz electromagnetic field induces activation of the Epstein-Barr virus genome in latently infected human lymphoid cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 16, 205-207
- Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J. (1992) Mechanism of electromagnetic interaction with cellular systems. *Naturwissenschaften* 79, 551-559
- Guénel P., Raskmark P., Bach Andersen J., Lyng E. (1993) Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark. *British Journal of Industrial Medicine* 50, 758-764

- Gutteridge JM. (1985) Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chemical and Biological Interaction* 56, 113-
- Gutteridge JM. & Halliwell B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the NY Academy of Sciences* 899, 136-147
- Gutteridge JM. & Quinlan GJ. (1993) Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role of iron-binding and iron-oxidizing proteins. *Biochimica and Biophysica Acta* 1156, 144-150
- Halliwell B. & Gutteridge JM. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Archive of Biochemics and Biophysics* 280, 1-8
- Harada S., Yamada S., Kuramata O., Gunji Y., Kawasaki M., Miyakawa T., Yonekura H., Sakurai S., Bessho K., Hosono R., Yamamoto H. (2001) Effects of high ELF magnetic fields on enzyme-catalyzed DNA and RNA synthesis *in vitro* and cell-free DNA mismatch repair. *Bioelectromagnetics* 22, 260-266
- Harakawa S., Inoue N., Saito A., Doge F., Nagasawa H., Suzuki N., Martin DE. (2004) 60 Hz electric field upregulates cytosolic Ca²⁺ level in mouse splenocytes stimulated by lectin. *Bioelectromagnetics* 25, 204-210
- Hartmann A. & Speit G. (1995) Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister chromatid exchanges (SCE). *Mutation Research* 346, 49-56
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins AR., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice RR. (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51
- Hartmann A., Plappert U., Raddatz K., Grunert-Fuchs M., Speit G. (1994) Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9, 269-272
- Hartnell JM., Storrie MC., Mooradian AD. (1989) The tissue specificity of the age-related changes in alkali-induced DNA unwinding. *Mutation Research* 219, 187-192
- Heby O. & Persson L. (1990) Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *TIBS* 15, 153-158
- Heredia-Rojas JA., Rodriguez De la Fuente AO., Del Roble Velazco-Campos M., Leal-Garza CH., Rodriguez-Flores LE., De la Fuente-Cortez B. (2001) Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes *in vitro*: sister chromatid exchange, cell kinetics and mitotic rate. *Bioelectromagnetics* 22, 145-149
- Higami Y., Shimokawa I., Okimoto T., Ikeda T. (2004) An age-related increase in the basal level of DNA damage and DNA vulnerability to oxygen radicals in the individual hepatocytes of male F344 rats. *Mutation Research* 316, 59-67
- Hu Q. & Hill RP. (1996) Radiosensitivity, apoptosis and repair of DNA double-strand breaks in radiation-sensitive Chinese hamster ovary cell mutants treated at different dose rates. *Radiation Research* 146, 636-645
- Huuskonen H., Juutilainen J., Julkunen J., Miaki-Paakkanen J., Komulainen H. (1998) Effects of low-frequency magnetic fields on fetal development in CBA/Ca mice. *Bioelectromagnetics* 19, 477-485
- Huuskonen H., Saastamoinen V., Komulainen H., Laitinen J., Juutilainen J. (2001) Effects of low-frequency magnetic fields on implantation in rats. *Reproductive Toxicology* 15, 49-59
- IARC (2001) Static and extremely low frequency electric and magnetic fields. *IARC* 80, 19-26

- Ieradi LA. & Cristaldi M. (1996) I Roditori infestanti come indicatori dell'inquinamento urbano: applicazioni e progettazione. IAED-Quaderno[5]. Roma. Inquinamento nelle aree urbane: ricerche di base e aspetti applicativi. 12-7-1996.
- Ieradi LA., Cristaldi M., Mascanzoni D., Cardarelli E., Grossi R., Campanella L. (1996) Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environmental Pollution* 92, 323-328
- Ivancsits S., Diem E., Jahn O., Rüdiger HW. (2003) Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way. *International Archive Occupational Environmental Health* 76, 431-436
- Jajte J., Grzegorzczak J., Zmyslony M., Rajkowska E. (2002) Effect of 7 mT static magnetic field and iron ions on rat lymphocytes: apoptosis, necrosis and free radical processes. *Bioelectrochemistry* 57, 107-111
- Jentsch TJ., Lehmann M., Schone E., Thoss F., Zimmermann G. (1993) Weak magnetic fields change extinction of a conditioned reaction and daytime melatonin levels in the rat. *Neuroscience Letters* 157, 79-82
- Jostes RF., Hui TE., Cross FT. (1993) Single cell gel technique supports hit probability calculations. *Health Physics* 64, 675-679
- Juutilainen J. & Lang S. (1997) Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. *Mutation Research* 387, 165-171
- Juutilainen J., Laara E., Pukkala E. (1990) Incidence of leukemia and brain tumours in Finnish workers exposed to ELF magnetic fields. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 62, 289-293
- Kabuto H., Yokoi I., Mori A., Ogawa N. (2000) Effects of an *in vivo* 60 Hz magnetic field on monoamine levels in mouse brain. *Pathophysiology* 7, 115-119
- Kadioglu E., Sardas S., Aslan S., Isik E., Esat Karakaya A. (2004) Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Department of Toxicology Faculty of Pharmacy Ankara* 9, 203-209
- Kammann U., Biselli S., Hühnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. (2004) Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution* 132, 279-287
- Kassie F., Parzefall W., Knasmuller S. (2000) Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research* 463, 13-31
- Kato A., Hishida A., Nakajima T. (1994) Effects of oxygen free radical scavengers on uranium-induced acute renal failure in rats. *Free Radic Biol Med* 16, 855-859
- Khalil AM. & Qassem W. (1991) Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes *in-vitro*: chromosome aberrations. Sister-chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutation Research* 247, 141-146
- Khan AA., Khan HM., Delincee H. (2004) DNA Comet Assay - a rapid screening method for detection of irradiated cereals and tree nuts. *Food Control* 16, 141-146
- Kheifets LI., Afifi AA., Buffler PA., Zhang ZW. (1995) Occupational electric and magnetic field exposure and brain cancer: a meta-analysis. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 37, 1327-1341
- Kleiman NJ. & Spector A. (1993) DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Current Eye Research* 12, 423-431

- Koppen G. & Verschaeve L. (1996) The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Research* 360, 193-200
- Koyama S., Nakahara T., Hirose H., Ding GR., Takashima Y., Isozumi Y., Miyakoshi J. (2004) ELF electromagnetic fields increase hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced mutations in pTN89 plasmids. *Mutation Research* 560, 27-32
- Kundi M., Hansson Mild K., Hardell L., Mattsson MO. (2004) Mobile telephones and cancer - A review of epidemiological evidence. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 7, 351-384
- Kwee S. & Raskmark (1994) P. Charge and Field Effects in Biosystems. [4], 255 Allen MJ, Cleary SF. and Sowers AE., World Scientific Singapore
- Labieniec M. & Gabryelak T. (2004) Response of DNA, proteins and membrane bilayer in the digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to tannins exposure. *Toxicology in Vitro* 18, 773-781
- Lacy F., Gough DA., Schmid-Schonbein GW. (1998) Role of xanthine oxidase in hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med* 25, 720-727
- Lagroye I., Anane R., Wettring BA., Moros EG., Straube WL., Laregina M., Niehoff M., Pickard WF., Baty J., Roti Roti JL. (2004) Measurement of DNA damage after acute exposure to pulsed-wave 2450 MHz microwave in rat brain cells by two alkaline comet assay methods. *International Journal of Radiation Biology* 80, 11-20
- Lai H. & Carino M. (1999) 60 Hz magnetic fields and central cholinergic activity: effects of exposure intensity and duration. *Bioelectromagnetics* 20, 284-289
- Lai H. & Singh NP. (1995) Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics* 16, 207-210
- Lai H. & Singh NP. (1997) Acute Exposure to a 60 Hz Magnetic Field Increases DNA Strand Breaks in Rat Brain Cells. *Bioelectromagnetics* 18, 156-165
- Lai H. & Singh NP. (2004) Magnetic field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environmental Health Perspectives* 112, 687-694
- Lednev VV. (1991) Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics* 12, 71-75
- Lehmann J., Pollet D., Peker S., Steinkraus V., Hoppe U. (1998) Kinetics of DNA strand breaks and protection by antioxidants in UVA- or UVB-irradiated HaCaT keratinocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 407, 97-108
- Lerchl A., Nonaka KO., Stokkan KA., Reiter RJ. (1990) Marked rapid alterations in nocturnal pineal serotonin metabolism in mice and rats exposed to weak intermittent magnetic fields. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 169, 102-108
- Liboff AR. (1986) Cyclotron resonance in membrane transport. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica, Torino).
- Lin H. & Goodman R. (1995) Electric and magnetic noise blocks the 60 Hz magnetic field enhancement of steady state c-myc transcript levels in human leukemia cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 36, 33-37

- Lindstrom E., Lindstrom P., Berglund A., Lundgren E., Mild KH. (1995) Intracellular Calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics* 16, 41-47
- Litovitz T., Montrose CJ., Doinov P., Brown KM., Barber M. (1994) Superimposing spatially coherent electromagnetic noise inhibits field induced abnormalities in developing chick embryos. *Bioelectromagnetics* 15, 105-113
- Litovitz T., Mullins JM., Krause D. (1991) Effect of coherence time of the applied magnetic field on ornithine decarboxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 178, 862-865
- Litovitz T., Penafiel LM., Farrel JM., Krause D., Meister R., Mullins JM. (1997) Bioeffects induced by exposure to microwaves are mitigated by superposition of ELF noise. *Bioelectromagnetics* 18, 422-430
- Liu DS., Astumian KD., Tsong TY. (1990) Activation of Na⁺ and K⁺ pumping modes of Na,K-ATPase by an oscillating electric field. *Journal of Biology and Chemistry* 265, 7260-7267
- London SJ., Thomas DC., Bowman JD., Sobel E., Cheng TC., Peters JM. (1991) Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia. *American Journal of Epidemiology* 134, 923-937
- Loomis DP., Savitz DA., Ananth CV. (1994) Breast cancer mortality among female electrical workers in the United States. *Journal of National Cancer Institute* 86, 921-925
- Lopucki M., Czekierdowski A., Rogowska W., & Kotarski J. (2004) The effect of oscillating low intensity magnetic field on the Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, and Mg⁺⁺ concentrations in the maternal and fetal circulation of the dually perfused human placental cotyledon. *Bioelectromagnetics* 25, 329-337
- Lovell PD., Thomas G., Dubow R. (1999) Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19, 109-119
- Male J. (1992) Biological effects of magnetic fields: a possible mechanism. *The new biologist* 39, 89
- Malyapa RS., Ahern EW., Straube WL., Laregina L., Pickard WF., Roti Roti JL. (1998) DNA damage in rat brain cells after *in vivo* exposure to 2450MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. *Radiation Research* 149, 637-645
- Manni V., Lisi A., Pozzi D., Rieti S., Serafino A., Giuliani L., Grimaldi S. (2002) Effects of extremely low frequency (50 Hz) magnetic field on morphological and biochemical properties of human keratinocytes. *Bioelectromagnetics* 23, 298-305
- Manni V., Lisi A., Rieti S., Serafino A., Ledda M., Giuliani L., Sacco D., D'Emilia E., Grimaldi S. (2004) Low electromagnetic field (50 Hz) induces differentiation on primary human oral keratinocytes (HOK). *Bioelectromagnetics* 25, 116-126
- Markov MS. (1981) Biological mechanisms of the magnetic field actions. *IEEE Transactions on Magnetics* 17, 2334-2337
- Markov MS. & Pilla AA (1994a) Modulation of cell-free myosin light chain phosphorylation with weak low frequency and static magnetic fields. In: *On the nature of electromagnetic fields interactions with biological systems.* (ed Frey AH.), pp. 127-141. Landes Company.
- Markov MS. & Pilla AA (1994b) Static magnetic field modulation of myosin phosphorylation: calcium dependence in two enzyme preparations. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 35, 57-61

- Markov MS., Ryaby JT., Kaufman JJ., Pilla AA. (1992) Charge and Field Effects in Biosystems. [3], 151 (eds. Allen MJ, Cleary SF., Sowers AE., and Shillady DD.) Birkäuser, Boston
- Markov MS., Wang S., Pilla AA (1993) Effects of weak low-frequency sinusoidal and DC magnetic fields on myosin phosphorylation in a cell-free preparation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 30, 119-125
- Marples B., Longhurst D., Eastham AM., West CM. (1998) The ratio of initial/residual DNA damage predicts intrinsic radiosensitivity in seven cervix carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer* 77, 1108-1114
- Marzin D. (1999) New approaches to estimating the mutagenic potential of chemicals. *Cell Biology and Toxicology* 15, 359-365
- Mattsson MO., Lindstrom E., Still M., Lindstrom P., Mild KH., Lundgren E. (2001) $[Ca^{2+}]_i$ rise in Jurkat E6-1 cell lines from different sources as a response to 550 Hz magnetic field exposure as a reproducible effect and independent of poly-L-lysine treatment. *Cell Biology International* 25, 901-907
- McCann J., Dietrich F., Rafferty C. (1998) The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutation Research* 411, 45-86
- McCann J., Dietrich F., Rafferty C., Martin AO. (1993) A critical review of genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutation Research* 297, 61-95
- McCurdy D., Tail LQ., Frias S., Wang Z. (1997) Delayed repair of DNA damage by ionising radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Radiation Research* 147, 48-54
- McKelvey-Martin VJ., Butler M., Stewart LH. (1992) Analysis of DNA content and integrity in cells extracted from bladder washing and voided urine specimens, in bladder cancer patients, using the comet assay. *Mutation Research* 271, 163
- McKelvey-Martin VJ., Green MH., Schmezer P., Pool-Zobel BL., De Meo MP., Collins A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): an European review. *Mutation Research* 288, 47-63
- McKelvey-Martin VJ., Ho ET., McKeown SR., Johnston SR., McCarthy PJ., Rajab NF., Downes CS. (1998) Emerging application of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent *in situ* hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individuals. *Mutagenesis* 13, 1-8
- McLeod KJ., Lee RC., Ehrlich HP. (1987) Frequency dependence of electric fields modulation of fibroblast protein synthesis. *Science* 236, 1465-1468
- McNamee JP., Bellier PV., McLean JRN., Marro L., Gajda GB., Thansandote A. (2002) DNA damage and apoptosis in the immature mouse cerebellum after acute exposure to a 1 mT, 60 Hz magnetic field. *Mutation Research* 513, 121-133
- Merk O. & Speit G. (1998) Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32, 260-268
- Merk O. & Speit G. (1999) Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 33, 167-172
- Merk O., Reiser K., Speit G. (2000) Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 471, 71-80

- Mevissen M., Kietzmann M., Loscher W. (1995) *In vivo* exposure of rats to a weak alternating magnetic field increases ornithine decarboxylase activity in the mammary gland by similar extent as the carcinogen DMBA. *Cancer Letters* 90, 207-214
- Miyaga Y., Zhang H., Wheeler KT. (1997) Radiation-induced DNA damage in tumours and normal tissues. IV. Influence of proliferation status and cell type on the formation of oxygen-dependent DNA damage in cultured cells. *Radiation Research* 148, 29-34
- Miyakoshi J., Yoshida M., Shibuya K., Hiraoka M. (2000) Exposure to strong magnetic fields at power frequency potentiates X-ray-induced DNA strand breaks. *Journal Radiation Research* 41, 293-302
- Miyamae Y., Iwasakai K., Kinoshita N., Tsuda S., Murakami M., Tanaka M., Sasaki YF. (1997) Detection of DNA lesion induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (comet) assay 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Research* 393, 107-113
- Moller P., Knudsen LE., Loft S., Wallin H. (2000) The Comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology Biomarker Prev* 9, 1005-1015
- Monteith DK. & Vanstone J. (1995) Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. *Mutation Research* 345, 97-103
- Moretti M., Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Pasquini R., Fatigoni C., Marchetti C. (2002) DNA damage and apoptosis in cells exposed or co.exposed to extremely-low-frequency electromagnetic fields (ELF-EM) and benzene. In: *Libro degli Atti* (ed IV Convegno FISV) Riva del Garda.
- Mullaart E., Boerrieger METI., Boer GJ., Vijg J. (1990) Spontaneous DNA breaks in the rat brain during development and aging. *Mutation Research* 237, 9-15
- Mullins JM., Krause D., Litovitz T. (1993) Simultaneous application of a spatially coherent noise field blocks response of cell cultures to a 60 Hz electromagnetic field. In: *Electricity and magnetism in biology and medicine*. (ed Blank M), pp. 345-346. San Francisco Press, San Francisco
- Murphy JC., Kaden DA., Warren A., Sivak A. (1993) Power frequency electric and magnetic fields: a review of genetic toxicology. *Mutation Research* 296, 221-240
- Nascimbeni B., Phillips MD., Croom DK., Andrews PW., Tice RR. (1991) Evaluation of DNA damage in golden mice (*Ochrotomys nutalli*) inhabiting a hazardous waste site. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 17, 55
- Noz KC., Bauwens M., van Buul PP., Vrolijk H., Schothorst AA., Pavel S., Tanke HJ., Vermeer BJ. (1996) Comet assay demonstrates a higher ultraviolet B sensitivity to DNA damage in dysplastic nevus cells than in common melanocytic nevus cells and foreskin melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 196, 1198-1202
- Obe G. & Natarajan AT. (1982) *Mechanism of the Origins of Structural Chromosomal Aberrations*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Okazaki M., Sakata S., Konaka R., Shiga T. (1987) Magnetic-field-dependent spin adduct yield in the photoreduction of naphthoquinones in SDS micellar solution. *Journal of Physics and Chemistry* 91, 1131-1137
- Oliva L. (1986) La magnetobiologia. Nuova frontiera della radiobiologia. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica), II edn, pp. 235-241. Torino.
- Olive PL. (1995) Detection of hypoxia by measurement of DNA damage in individual cells from spheroids and murine tumours exposed to bioreductive drugs. II. RSU-1069. *British Journal of Cancer* 71, 537-542

- Olive PL. (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International Journal of Radiation Biology* 75, 395-405
- Olive PL. & Banáth JP. (1993) Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and ¹²⁵IIdUrd. *International Journal of Radiation Biology* 64, 349-358
- Olive PL. & Banáth JP. (1995) Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research* 221, 19-26
- Olive PL. & Banáth JP. (1997) Multicell spheroid response to drugs predicted with the comet assay. *Cancer Research* 57, 5528-5533
- Olive PL., Banáth JP., Durand RE. (1990a) Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *Journal of National Cancer Institute* 82, 779-783
- Olive PL., Banáth JP., Durand RE. (1990b) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation Research* 122, 69-72
- Olive PL., Durand RE., Le Riche J., Olivotto I., Jackson SM. (1993) Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Research* 53, 733-736
- Olive PL., Johnston PJ., Banáth JP., Durand RE. (1998) The Comet assay: a new method to examine heterogeneity associated with solid tumors. *Nature Medicine* 4, 103-105
- Olive PL., Wlodek D., Banáth JP. (1991) DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research* 51, 4671-4676
- Olive PL., Wlodek D., Durand RE., Banáth JP. (1992) Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research* 198, 259-267
- Olsen JH., Nielsen A., Schulgen G. (1993) Residence near high voltage facilities and risk of cancer in children. *Biomedical Journal* 307, 891-895
- Ostling O. & Johanson KJ. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298
- Ostling O. & Johanson KJ. (1987) Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *International Journal of Radiation Biology* 52, 683-691
- Ottaviani E., Malagoli D., Ferrari A., Tagliazucchi D., Conte A., Gobba F: (2002) 50 Hz magnetic fields of varying flux intensity affect cell shape changes in invertebrate immunocytes: the role of potassium ion channels. *Bioelectromagnetics* 23, 292-297
- Pasquini R., Villarini M., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Moretti M. (2003) Micronucleus induction in cells co-exposed *in vitro* to 50 Hz magnetic field and benzene, 1,4-benzenediol (hydroquinone) or 1,2,4-benzenetriol. *Toxicology in Vitro* 17, 581-586
- Pfuhler S. & Wolf HU. (1996) Detection of DNA crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 27, 196-201
- Phillips JL., Haggren W., Thomas WJ., Ishida-Jones T., Ross Adey W. (1992) Magnetic field-induced changes in specific gene transcription. *Biochimica and Biophysica Acta* 1132, 140-144

- Pilla AA., Muehsam DJ., Markov MS. (1997) A dynamical systems/Larmor precession model for weak magnetic field bioeffects: ion binding and orientation of bound water molecules. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, 239-249
- Pool-Zobel BL., Klein RG., Liegibel UM., Kuchenmeister F., Weber S., Schmezer P. (1992) Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalational administration to Sprague Dawley rats. *Clinic Investigation* 70, 299-306
- Pool-Zobel BL., Lotzmann N., Knoll M., Kuchenmeister F., Lambertz R., Leucht U., Schroder HG., Schmezer P. (1994) Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 24, 271-281
- Popp FA. (1979). Photons, and their Importance to Biology. Proceeding International Symposium on Wave Therapeutics, 43-59 Wolkowski ZW Versailles, Paris.
- Portier CJ. & Wolfe MS. (1998) *National Institute of Environmental Health Science Working Group Report Assessment of health effects from exposure to power.line frequency electric and magnetic fields*. Research Triangle Park: NIH.
- Potenza L., Cucchiari L., Piatti E., Angelini U., Dachà M. (2004) Effects of high static magnetic field exposure on different DNAs. *Bioelectromagnetics* 25, 3352-355
- Pyrpasopoulou A., Kotoula V., Cheva A., Hytioglou P., Nikolakaki E., Magras IN., Xenos TD., Tsiboukis TD., Karkavelas G. (2004) Bone morphogenetic protein expression in newborn rat kidneys after prenatal exposure to radiofrequency radiation. *Bioelectromagnetics* 25, 216-227
- Raskmark P. & Kwee S. (1996) The minimizing effect of electromagnetic noise on the changes in cell proliferation caused by ELF magnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 40, 193-196
- Reiter RJ. & Richardson BA. (1992) Magnetic field effects on pineal indoleamine metabolism and possible biological consequences. *FASEB Journal* 6, 2283-2287
- Repacholi MH. & Greenebaum B. (1999) Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 20, 133-160
- Ridella S. (1986) Meccanismi dell'interazione dei campi elettromagnetici con i sistemi biologici. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica), II edn, pp. 243-248. Torino.
- Robbiano L., Baroni D., Carrozzino R., Mereto E., Brambilla G. (2004) DNA damage and micronuclei induced in rat and human kidney cells by six chemicals carcinogenic to the rat kidney. *Toxicology* 204, 187-195
- Rodriguez M., Petitclerc D., Burchard JF., Nguyen DH., Block E. (2004) Blood melatonin and prolactin concentrations in dairy cows exposed to 60 Hz electric and magnetic fields during 8h photoperiods. *Bioelectromagnetics* 25, 508-515
- Rojas E., Lopez MC., Valverde M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal Chromatography Biomedical Application* 722, 225-254
- Rosenthal M. & Obe G. (1989) Effects of 50-Hertz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. *Mutation Research* 210, 329-335
- Rossi P., Grandi C., Benvenuti F. (1999) Inquinamento da campi elettromagnetici non ionizzanti. *Le scienze quaderni* 109, 113-120

- Roti Roti JL. & Wrigth WD. (1987) Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells; assay for DNA damage and repair. *Cytometry* 8, 461-467
- Rundell MS., Wagner ED., Plewa MJ. (2003) The Comet Assay: Genotoxic damage or Nuclear fragmentation? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42, 61-67
- Ryan BM., Mallett E., Johnson TR., Gauger JR., McCormick DL. (1996) Developmental toxicity study of 60 Hz (Power Frequency) magnetic fields in rats. *Teratology* 54, 73-83
- Rydberg B. (1984) Detection of DNA strand breaks in single cells using flow cytometry. *International Journal of Radiation Biology* 46, 521-527
- Rydberg B. & Johanson KJ. (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA repair Mechanisms* (eds Hanawalt PC., Friedberg EC. & Fox CF.), pp. 465-468. Academic Press, New York.
- Salagovic J., Gilles J., Verschaeve L., Kalini I. (1996) The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworm: a promising tool for assessing the biological hazard of pollution sites. *Folia Biologica (Praha)* 42, 17-21
- Salzer BA. & Schallreuter KU. (1995) Investigation of the personality structure in patients with vitiligo and a possible association with impaired catecholamine metabolism. *Dermatology* 190, 109-115
- Santos SJ., Singh NP., Natarajan AT. (1997) Fluorescence *in situ* hybridization with comets. *Experimental Cell Research* 232, 407-411
- Sarkaria JN., Buss C., Eady JJ., Peacock JH., Steel GG., Arnold JR. (1998) Comparison between pulsed-field gel electrophoresis and the comet assay as predictive assays for radiosensitivity in fibroblasts. *Radiation Research* 150, 17-22
- Sasaki YF., Fujikawa K., Ishida K., & et al. (1999) The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP. *Mutation Research* 440, 1-18
- Sauer H., Rahimi G., Hescheler J., Wartenberg M. (1999) Effects of electrical fields on cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 75, 710-723
- Savitz DA. & Loomis DP. (1995) Magnetic field exposure in relation to leukemia and brain cancer mortality among electric utility workers. *American Journal of Epidemiology* 141, 123-134
- Savitz DA., Wachtel H., Barnes FA., John EM., Tvrđik JG. (1988) Case-control study of childhood cancer and exposure to 60 Hz magnetic fields. *American Journal of Epidemiology* 128, 21-38
- Scaiano JC. (1995) Magnetic field effects on free radical chemistry: their chemical basis and possible influence on biological processes. *Spectrum* 8, 1-10
- Scalia M. (2001) L'ambiente elettromagnetico nel comprensorio dei Monti Prenestini. [28]. Bologna, Soc. Ed. Andromeda. Fuori Collana.
- Scarfi MR., Lioi MB., Zeni O., Della Noce M., Franceschi C., Bersani F. (1999) Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields. *Health Physics* 76, 244-250
- Schallreuter KU., Moore J., Wood JM., Beazley WD., Gaze DC., Tobin DJ., Marshall HS., Panske A., Panzig E., Hibberts NA. (1999) *In vivo* and *in vitro* evidence for Hydrogen peroxide accumulation in the epidermis of patients with vitiligo and its successful removal by a UVB-activated pseudocatalase. *Journal of Investigation in Dermatology* 4, 91-96

Schallreuter KU., Moore J., Wood JM., Beazley WD., Peters EM., Marles LK., Behrens-Williams SC., Dummer R., Blau N., Thöny B. (2001) Epidermal H₂O₂ accumulation alters tetrahydrobiopterin (6BH₄) recycling in vitiligo: Identification of a general mechanism in regulation of all 6BH₄-dependent processes? *Journal of Investigation in Dermatology* 116, 167-174

Schwan MP. (1986) Biophysics of the interaction of electromagnetic energy with cells and membrane. In: *Campi Magnetici in Medicina* (ed Minerva Medica), pp. 213. Torino.

Serpseru EH. & Tsong TY. (1984) Activation of electrogenic Rb⁺ transport of (Na,k)-ATPase by an electric field. *Journal of Biology and Chemistry* 259, 7155-7162

Sher L. (2000) The effects of natural and man-made electromagnetic fields on mood and behavior: the role of sleep disturbances. *Medical Hypotheses* 54, 630-633

Silverman C. (1973) Nervous and behavioral effects of microwave radiation in humans. *American Journal of Epidemiology* 97, 219-224

Singh NP. & Lai H. (1998) 60 Hz magnetic field exposure induces DNA crosslinks in rat brain cells. *Mutation Research*. 400, 313-320

Singh NP., Danner DB., Tice RR., Pearson JB., Brant LJ., Schneider EL. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutation Research* 248, 123-130

Singh NP., McCoy MT., Tice RR., Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191

Snow ET. (1992) Metal carcinogenesis: mechanistic implications. *Pharmacological Therapy* 53, 31-65

Soja G., Kunsch B., Gerzabek M., Reichenauer T., Soja AM., Rippar G., Bolhár-Nordenkampf HR. (2003) Growth and yield of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.) near a high voltage transmission line. *Bioelectromagnetics* 24, 91-102

Speit G. & Hartmann A. (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (Comet assay). *Mutagenesis* 10, 555-559

Speit G. & Merk O. (1999) Detection of crosslinks with the comet assay. *Neoplasma* 46, 76-77

Speit G. & Merk O. (2002) Evaluation of mutagenic effects of formaldehyde *in vitro*: detection of crosslinks and mutations in mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* 17, 183-187

Strauss GH., Peters WP., Everson RB. (1994) Measuring DNA damage in individual cells of heterogeneous mixtures: a novel application of an immunological typing technique. *Mutation Research* 304, 211-216

Stronati L., Testa A., Villani P., Marino C., Lovisolo GA., Conti D., Russo F., Fresegna AM., Cordelli E. (2004) Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay, chromosome aberration, micronucleus and sister chromatid exchange analyses. *Bioelectromagnetics* 25, 41-48

Suri A., de Boer J., Kusser W., Glickman BW. (1996) A 3 milliTesla 60 Hz magnetic field is neither mutagenic nor Co-Mutagenic in the presence of menadione and MNU in a transgenic rat cell line. *Mutation Research* 372, 23-31

Suzuki M., Hei TK., Hall EJ., Piao CQ., Fujitaka K. (2001) Cell killing and chromosomal damage in primary human bronchial epithelial cells irradiated with accelerated 56Fe ions. *Biol Science Space* 15, 270-271

- Svedenstal BM. & Johanson KJ. (1998) Effects of exposure to 50 Hz or 20 Hz magnetic fields on weights of body and some organs of CBA mice. *In Vivo* 12, 293-298
- Svedenstal BM., Johanson KJ., Hansson Mild K. (1999a) DNA damage induced in brain cells of CBA mice exposed to magnetic fields. *In Vivo* 13, 551-552
- Svedenstal BM., Johanson KJ., Mattsson MO., Paulson LE. (1999b) DNA damage, cell kinetics and ODC activities studied in CBA mice exposed to electromagnetic fields generated by transmission lines. *In Vivo* 13, 507-514
- Tablado L., Pérez-Sánchez F., Nunez J., Nunez M., Soler C. (1998) Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology and morphometry of mouse epididymal sperm. *Bioelectromagnetics* 19, 377-383
- Tang Q., Chen G., Zhao N. (1998) Effects of ELF electric field on proliferation of mouse osteoblastic cells. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 47, 349-353
- Teoule R. (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair. *International Journal of Radiation Biology* 51, 573-589
- Tian F., Nakahara T., Yoshida M., Honda N., Hirose H., Miyakoshi J. (2002) Exposure to power frequency magnetic fields suppresses X-ray-induced apoptosis transiently in Ku80-deficient xrs5 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292, 355-361
- Tice RR. (1995a) Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. (ed. FM Butterworth). Plenum Press, New York, in press
- Tice RR. (1995b) The single cell gel/ Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: *Environmental Mutagenesis* (eds Phillips DH & Venitt S.), pp. 315-339. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Tice RR. & Strauss GH. (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13, 207-214
- Tice RR. & Vasquez M. (1999) Protocol for the application of the pH > 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Medline
- Tice RR., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu JC., Sasaki YF. (2000) Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221
- Tice RR., Andrews PW., Hirai O., Singh NP. (1991) The single cell gel (SGC) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. In: *Biological Reactive Intermediates IV, Molecular and Cellular Effects and Their Impact on Human Health* (eds Witmer CR., Snyder RR., Jollow DJ., Kalf GF., Kocsis JJ. & Sipes IG.), pp. 157-164. Plenum Press, New York.
- Tice RR., Andrews PW., Singh NP. (1990) The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: *Methods for the Detection of DNA dDamage in Human Cells* (eds Sutherland B. & Woodhead A.), pp. 291-301. New York.
- Tice RR., Hook GG., Donner M., McRee DI., Guy AW. (2002) Genotoxicity of radio frequency signals. I. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics* 23, 113-126

- Tice RR., Strauss GH., Peters WP. (1992) High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 271, 101-113
- Tice RR., Yager JW., Andrews P., Crecelius E. (1997) Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite. *Mutation Research* 386, 315-334
- Tribukait B., Cekan E., Paulsson LE. (1987) Effects of pulsed magnetic fields on embryonic development in mice. In: *Work with Display Units* (eds Knave B. & Widebeck PG.), pp. 129-134. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Tynes T. & Haldorsen T. (1997) Magnetic fields and cancer in children residing near Norwegian high voltage power lines. *American Journal of Epidemiology* 145, 219-226
- Van Den Heuvel R., Leppens H., Nêmethova G., Verschaeve L. (2001) Haemopoietic cell proliferation in murine bone marrow cells exposed to extreme low frequency (ELF) electromagnetic fields. *Toxicology in Vitro* 15, 351-355
- Verkasalo PK., Pukkala E., Hongisto M., Valjus JE, Jarvinen PJ., Heikkala KV., Koskenvuo M. (1993) Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. *Biomedical Journal* 307, 895-899
- Verschaeve L., Gilles J., Schoctors J., van Cleuvenbergen R., De Fre R. (1993) The single cell gel electrophoresis technique or comet test for monitoring dioxin pollution and effects. In: *Organohalogen Compounds 11* (eds Fiedler H., Frank H., Hutzinger O., Parzefall W., Riss A. & Safe S.), pp. 213-216. Federal Environmental Agency, Austria.
- Vijayalaxmi, Tice RR., Strauss GH. (1992) Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research* 271, 243-252
- Wallace SS. (1988) AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 12, 431-477
- Wardd TH., Butler J., Shabakhti H., Richards JT. (1997) Comet assay studies on the activation of two diaziridinylbenoquinones in K562 cells. *Biochemical Pharmacology* 53, 1115-1121
- Wei M., Guizzetti M., Yost M., Costa LG: (2000) Exposure to 60 Hz magnetic fields and proliferation of human astrocytoma cells in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 162, 166-176
- Wertheimer N. & Leeper E. (1979) Electrical wiring configurations and childhood cancer. *American Journal of Epidemiology* 109, 273-284
- Wey HE., Conover DP., Mathias P., Toraason M., Lotz WG. (2000) 50 Hertz magnetic field and calcium transients in Jurkat cells: results of a research and public information dissemination (RAPID) program study. *Environmental Health Perspectives* 108, 135-140
- Wiklund SJ. & Agurell E. (2003) Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 18, 167-175
- Wolkowski ZW., Sedlak W., Zon J., Jodkowska G. (1979) Mechanisme plasmique de la reception du rayonnement electromagnetique a basse frequence par le systemes vivants. (eds. Wolkowski ZW). Proceed. International Symposium on Wave Therapeutics, Paris.139-158.
- Wrensch M., Boundy ML., Wienche J., Yost M. (1993) Environmental risk factors for primary malignant brain tumors: A review. *Journal of Neuroocology* 17, 47-64

Wu RY., Chiang H., Hu GL., Zeng QL., Bao JL. (2000) The effect of 50 Hz magnetic field on GCSmRNA expression in lymphoma B cell by mRNA differential display. *Journal of Cellular Biochemistry* 79, 460-470

Yaga K., Reiter RJ., Manchester LC., Nieves H., Sun JH., Chen LD. (1993) Pineal sensitivity to pulsed static magnetic fields changes during the photoperiod. *Brain Research Bulletin* 30, 153-156

Yoshikawa T., Tanigawa M., Tanigawa T., Imai A., Hongo H., Kondo M. (2000) Enhancement of nitric oxide generation by low frequency electromagnetic field. *Pathophysiology* 7, 131-135

Zamble DB. & Lippard SJ. (1995) Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends of Biochemical Science* 20, 435-439

Zmyslony M., Palus J., Dziubaltowska E., Politanski P., Mamrot P., Rajkowska E., Kamedula M. (2004) Effects of *in vitro* exposure to power frequency magnetic fields on UV-induced DNA damage of rat lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 25, 560-562

Siti Internet

www.cometassay.com

www.vaslombardia.org/immissioni/conv_delgiudice.htm

Del Giudice E. (2004) Influenze dei campi elettromagnetici sugli esseri viventi.

www.verdinrete.it/ondakiller

Area Elettrosmog (2004) Elettrosmog Pericolo invisibile

Soffritti M. (1999) I campi elettromagnetici a bassissima frequenza (CEMBF) ed i loro effetti sulla salute.

7. APPENDICE

Grandezze ed Unità di Misura

ELETTRICITÀ

Carica elettrica (q) si misura in **coulomb (C)**

È una proprietà fondamentale, di origine sperimentale, di un corpo
La carica elementare è quella dell'elettrone.

Corrente elettrica (i) si misura in **ampère (A)**

È una migrazione di particelle cariche

Forza elettromotrice (fem) o Differenza di potenziale (ΔV) si misura in **volt (V)**

Si chiama differenza di potenziale elettrico, tra due punti A e B, il rapporto $\Delta V = (\Delta U/q)$ dove ΔU è la differenza di energia potenziale elettrica associata al passaggio della carica q da A a B.

Intensità di campo elettrico (E) si misura in **volt al metro (V/m)**

È, in ogni punto, il rapporto tra la forza F che agisce su una carica q e la carica stessa ($E = F/q$)

MAGNETISMO

Intensità di campo magnetico (B) si misura in **ampère al metro (A/m)**

B è, in ogni punto, uguale alla forza che subirebbe un filo di lunghezza unitaria (1 m) attraversato da una corrente unitaria (1 A) collocato perpendicolarmente alle linee del campo.

A volte si usa esprimere B in **tesla (T)** o **gauss** ($1 \text{ gauss} = 10^{-4} \text{ T}$), propriamente unità di Densità di flusso magnetico (numero di linee di flusso che attraversano un superficie piana unitaria perpendicolare al campo B, proporzionale al valore del campo B).

ONDE ELETTROMAGNETICHE

Frequenza (ν) si misura in **hertz (Hz)**

Numero di oscillazioni compiute nell'unità di tempo.

Lunghezza d'onda (λ) si misura in **metri (m)**

Distanza in linea retta tra due creste successive di un onda.

Periodo si misura in **secondi (s)**

Intervallo di tempo compreso tra il passaggio di due creste consecutive dell'onda per uno stesso punto.

DOSIMETRIA

Dose assorbita si misura in **gray (Gy)**

Dose assorbita di qualsiasi radiazione ionizzante che cede 1 J di energia per ogni chilogrammo di materia attraversata.

SAR si misura in **watt per chilo (W/Kg)**

Quantità che descrive l'assorbimento, nei tessuti, di potenza dai campi elettromagnetici.

Tutte le unità di misura hanno multipli e sottomultipli, i principali dei quali sono:

chilo	K	= 10 ³	milli	m	= 10 ⁻³
mega	M	= 10 ⁶	micro	μ	= 10 ⁻⁶
giga	G	= 10 ⁹	nano	n	= 10 ⁻⁹

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone che, in diversa misura, hanno dato il loro contributo nel corso dei tre anni di dottorato alla conclusione di questo progetto.

Innanzitutto ringrazio l'Istituto Superiore per la prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (I.S.P.E.S.L.) per aver finanziato il progetto "Sorveglianza ambientale di popolazioni naturali di piccoli mammiferi roditori ed insettivori esposti a campi elettromagnetici locali" (Referente Dr. L. Giuliani) all'interno del quale è inserita la ricerca oggetto della presente tesi, e in particolare l'Ing. Angelico Bedini e il Perito nucleare Raffaele Palomba (I.S.P.E.S.L.) per aver curato la costruzione e la messa a punto dei solenoidi utilizzati per l'esposizione degli animali. Un grazie va alla la Prof.ssa Rita Canipari (Dip. Istologia ed Embriologia Medica, "La Sapienza") che gentilmente ha fornito gli animali utilizzati negli esperimenti e alla Prof.ssa Renata Cozzi (Dip. Biologia, "Roma Tre") che ha messo a mia disposizione il suo laboratorio e la strumentazione per l'analisi dei preparati del Comet assay durante la fase di lettura. Si ringraziano la Prof.ssa Ada Maria Tata e in particolar modo la Prof.ssa Carla Cioni per la consulenza offerta nelle fasi preliminari della ricerca.

Particolare riconoscenza va alla la Prof.ssa Diana Anderson (Dep. Biomedical Science, University of Bradford, UK) per avermi ospitato nel suo laboratorio dandomi la possibilità di apprendere la tecnica del *Comet assay* e di conseguenza a Cesar Falque-Gonzales che ha mi ha seguito ed insegnato i segreti di questa tecnica.

Infine vorrei esprimere la mia gratitudine alle persone più importanti che mi hanno dato la possibilità di realizzare questo dottorato. In primo luogo al mio docente guida, il Prof. Mauro Cristaldi, che in questi anni mi ha seguita e dato fiducia anche nei momenti più complessi e alla Dr.ssa Luisanna Ieradi la cui presenza in laboratorio si è sempre rivelata indispensabile sia da un punto di vista scientifico che umano. Un grazie di cuore anche alla Prof.ssa Caterina Tanzarella per i suoi preziosi consigli e suggerimenti nella fase di correzione e revisione nella stesura finale della tesi.

Un ricordo affettuoso a tutti i ragazzi del laboratorio, in particolare a Daniele e Ion per la compagnia e la disponibilità dimostrate sempre.

Un grazie tutto particolare a Edu, "novio scientifico", per aver avuto la pazienza di sopportarmi e aspettarmi e per avermi sempre consigliato e incoraggiato.

Un grazie di cuore a Paolo e Teresa, genitori insostituibili che hanno condiviso con me non solo giornate ma anche notti di lavoro.

8.1. Pubblicazioni e Poster congressuali preparati durante il corso del dottorato

Cristaldi M., **Chiuchiarelli G.**, Ieradi L. A., Tanzarella C., Cozzi R., Grossi R., Campanella L., Moreno S. Biomonitoring of Genetic Damage on Algerian Mouse (*Mus spretus*) as a Sentinel Species in Doñana National Park (1995-2000). In: DelValls & Blasco eds. Integrated assessment and management of the ecosystems affected by the Aznalcollar mining spill (SW, Spain). IOC/ICAM/UNESCO Technical report. *In press*.

Cristaldi M., **Chiuchiarelli G.**, 2003. Il monitoraggio delle popolazioni murine di ambiente urbano come sistema di controllo della qualità dell'ambiente. SNOP 61, 61-68.

Schallreuter K., **Chiuchiarelli G.**, Cemeli E., Elwary SM., Gillbro JM., Spencer JD., Rokos H., Panske A., Chavan B., Wood JM., Anderson D. Oestrogen can contribute to hydrogen peroxide generation and DNA damage in peripheral blood lymphocytes from patients with vitiligo. *Endocrinology. Submitted.*

Chiuchiarelli G., Migliorini D. *Mus spretus* (Lataste, 1883) as bio-indicator of environmental stress by chemical pollution. 8th International Conference "Rodens & Spatium", Louvain-la-Neuve, Belgio, luglio 22-26/2002.

Udroiu I., Migliorini D., **Chiuchiarelli G.**, Cristaldi M., Ieradi LA. Applications and perspectives for the use of mammals as bio-indicators. International Union of Biological Sciences. 12th International Symposium on Biological Indicators. Hong Kong, dicembre 2-5/2003.