

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI
DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE -
XX CICLO

Ritardo di sviluppo di coorti di *Xenopus laevis*
in prometamorfosi esposte a campi magnetici a bassa
frequenza e confronto del contenuto di melatonina
retinica tra esposti e controlli

BIO/06 ANATOMIA COMPARATA E CITOLOGIA

Coordinatore

Chiar.mo Prof. *Giorgio Prantera*

Tutor

Chiar.mo Prof. *Maurizio Severini*

Dottoranda

Dr.ssa *Roberta Alilla*

INDICE

INTRODUZIONE	4
1 EFFETTI BIOLOGICI DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI	9
1.1 Radiazione e campi elettromagnetici	9
1.2 Evidenze sperimentali degli effetti biologici dei campi elettromagnetici	10
1.2.1 Ritardo di sviluppo	12
1.2.2 Effetti alla frequenza di risonanza di ciclotrone	13
1.3 Melatonin hypothesis	15
2 CONCETTI DI BASE DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI BIOLOGICHE	16
2.1 Definizioni	16
2.2 Il vivente come Sistema fisico	17
2.3 L'evoluzione dei Modelli di Dinamica di Popolazione	19
2.3.1 Dinamica di popolazioni strutturate	21
3 IL MODELLO BIOLOGICO	28
3.1 Lo <i>Xenopus laevis</i>	28
3.2 Il modello di sviluppo dello <i>Xenopus</i>	31
4 PARTE I: ESPERIMENTI CAMPI A BASSA FREQUENZA E DINAMICA DI POPOLAZIONE	35
4.1 Protocollo sperimentale	35
4.2 Apparato sperimentale	37
4.3 Gestione dei dati sperimentali	40
4.4 Analisi della varianza (ANOVA) e F-test	41
5 RISULTATI	45
5.1 Esperimenti della I serie	45
5.1.1 Andamento delle frequenze di maturazione delle coorti	45
5.1.2 Andamento delle frequenze cumulate	50
5.1.3 Indice di sviluppo S_j	50
5.1.4 Analisi statistica dei dati	54
5.2 Esperimenti della II serie	56
5.2.1 Andamento delle frequenze di maturazione delle coorti	56
5.2.2 Andamento delle frequenze cumulate	61
5.2.3 Indice di sviluppo S_j	61
5.2.4 Analisi Statistica dei dati	65
5.3 Analisi statistica del ritardo al giorno $j=22$	66

6	PARTE II: ESPERIMENTI CAMPI A BASSA FREQUENZA E MELATONINA	68
6.1	Melatonina	68
6.1.1	Melatonina negli Anfibi	70
6.2	Protocollo sperimentale	74
6.3	Apparato espositivo	75
6.4	Test ELISA	77
7	RISULTATI	78
7.1	Analisi statistica del ritardo al giorno $j=22$	78
7.2	Grafici primo esperimento	79
7.3	Grafici secondo esperimento	80
7.3.1	Analisi statistica dei dati di concentrazione	82
	CONCLUSIONI	83
	Appendice A	86
	Appendice B	88
	Appendice C	91
	BIBLIOGRAFIA	103
	Abstract	114
	Riassunto	117

INTRODUZIONE

Lo sviluppo industriale della società umana è legato strettamente alla scoperta dell'elettromagnetismo ed al progresso delle tecnologie, che su esso si fondano, impiegate tanto nelle applicazioni energetiche quanto nella gestione delle informazioni. A partire dalla prima metà del XX secolo infatti, l'energia elettrica è divenuta rapidamente il vettore energetico dominante nelle fabbriche per poi imporsi sempre più anche nei servizi e negli impieghi domestici. Quale conseguenza dello sviluppo industriale, la biosfera si è trovata esposta a campi elettrici, magnetici ed elettromagnetici *artificiali*, mai sperimentati prima nel corso della propria storia evolutiva. Tali campi si sono sovrapposti a quelli *naturali*, come il campo magnetico terrestre¹ ed il campo geoelettrico², con i quali nel tempo gli organismi hanno imparato a convivere sviluppando, in taluni casi, degli adattamenti (alcuni Uccelli, ad esempio, vengono guidati nelle loro migrazioni dal campo geomagnetico, grazie alla presenza di cristalli di magnetite nelle ossa craniche).

Le principali componenti dei campi elettromagnetici originati dalle attività umane, comunemente indicati con i termini di “inquinamento elettromagnetico” o “elettrosmog”, appartengono agli intervalli delle radiazioni non ionizzanti a bassa ed alta frequenza. Le radiazioni trattate appartengono alla prima categoria ed in particolare alle bande ELF (Extremely-Low Frequency: 3-300 Hz) e VLF (Very-Low Frequency: 300-3000 Hz). L'inquinamento elettromagnetico a cui gli individui sono quotidianamente esposti è principalmente determinato dalle frequenze delle linee di trasmissione dell'energia elettrica a 50 Hz in Europa e 60 Hz negli Stati Uniti, nell'intervallo quindi denominato ELF. Per tali frequenze, caratterizzate da una elevata lunghezza d'onda, il campo elettrico ed il campo magnetico si comportano come grandezze indipendenti tra loro [Ptitsyna et al., 1998] ed anche nei confronti dell'interazione con i sistemi biologici il comportamento è diverso. Il campo elettrico è fortemente influenzabile dalla presenza di elementi conduttori di elettricità, per cui nei tessuti con elevato contenuto d'acqua, i valori di campo vengono fortemente perturbati. Tale caratteristica contribuisce ad attenuare i valori del campo elettrico nell'interazione con la materia vivente e lo rende inoltre facilmente schermabile. Per quanto riguarda il campo magnetico, la problematica è invece molto più complessa,

¹ L'intensità del campo geomagnetico varia da 20 a 70 μT dall'equatore verso i poli ed è pressoché costante a ciascuna latitudine.

² L'ampiezza del campo geoelettrico, alla superficie del Pianeta, può variare dai 100 Vm^{-1} in giorni sereni fino ad alcune migliaia di Vm^{-1} in presenza di nubi temporalesche [Polk, 1991].

infatti esso pur decadendo rapidamente con l'aumentare della distanza dalla sorgente, è difficilmente schermabile se non con l'impiego di materiali dalle caratteristiche magnetiche particolari, e può quindi penetrare liberamente all'interno dei tessuti biologici [Ptitsyna et al., 1998].

Le radiazioni ELF non possiedono fotoni di energia sufficiente per indurre fenomeni di ionizzazione nelle molecole o per rompere legami chimici anche molto deboli. Perciò i campi elettromagnetici generati da queste radiazioni (non ionizzanti) sono stati considerati per lungo tempo incapaci di interagire con la materia organica. Prima degli anni '60, si pensava che gli effetti dei campi magnetici ed elettrici sugli organismi fossero imputabili unicamente alla loro ampiezza. Secondo il modello termico, allora accreditato, l'energia trasportata dalla radiazione sarebbe stata ceduta sotto forma di calore il che determinava un aumento della temperatura dei tessuti irradiati, senza che la frequenza avesse un ruolo apprezzabile.

Soltanto nel decennio successivo, l'interesse suscitato dalle ricerche di Wertheimer & Leeper (1979) da un lato, in cui si avanzava l'ipotesi di una associazione tra la residenza nei pressi di grandi elettrodotti e l'insorgere di gravi patologie infantili (come la leucemia) e gli studi *in vitro* condotti da Adey, inerenti l'effetto dei campi ELF sul flusso di ioni di calcio radioattivo nelle cellule cerebrali di pulcino (Kaczmarek & Adey, 1974) dall'altro, fecero sì che iniziò a tracciarsi una linea di ricerca nell'ambito. Gli studi sperimentali di Adey in particolare, misero in evidenza che un segnale a 147 MHz (portante) modulato in ampiezza con segnali sinusoidali a frequenze ELF diverse, alterava l'efflusso dello ione Ca^{++} , senza modificare termicamente il sistema. In corrispondenza di particolari valori di frequenza (9, 11 e 16 Hz), egli osservò un aumento significativo degli efflussi di Ca^{++} rispetto alle condizioni di controllo (assenza di campo), con un massimo a 16 Hz e non oltre (Bawin et al., 1975). Questo andamento del flusso non rispecchiava una dipendenza lineare, anzi l'effetto sullo ione era selettivo in frequenza. Il fenomeno venne definito '*effetto finestra*'. Successivamente Blackman sperimentò che l'esposizione ad un campo elettrico di frequenza pari a 16 Hz (il valore a cui Adey osservò l'efflusso massimo), faceva aumentare i flussi di ioni calcio nel cervello di pulcino solo in corrispondenza di particolari ampiezze (6 V/m, 40 V/m) [Blackman et al., 1982]. Ciò permise di dire che l'effetto finestra è presente sia in frequenza che in ampiezza, ossia che i campi ELF interagiscono con la materia biologica quando si verificano determinate combinazioni di questi parametri.

Nei due decenni successivi vennero svolti numerosi esperimenti da parte di differenti gruppi di ricerca nel mondo, nei quali si provò a replicare i risultati di Adey e Blackman, tra questi alcuni dimostrarono che i campi ELF procuravano malformazioni negli embrioni di pollo esposti [Delgado et al., 1982; Ubeda et al., 1983; Juutilainen et al., 1986; Leal et al., 1989; Martin, 1992; Koch et al., 1993; Farrel et al., 1997], mentre altri no [Maffeo et al., 1984; Sandstrom et al., 1986; Siskin et al., 1986]. Nell'ambito della discussione riguardante le malformazioni, in alcuni esperimenti venne evidenziata, come 'effetto secondario', un'influenza dell'esposizione ai campi elettromagnetici a bassa frequenza sul tasso di sviluppo del modello biologico impiegato. Ubeda notò, infatti, che due campi magnetici di stessa frequenza (100 Hz) e differenti ampiezze (1 μ T and 13.9 μ T) causavano diversi effetti sul tasso di sviluppo. In particolare, il campo d'intensità maggiore produceva ritardo di sviluppo negli embrioni di pollo esposti [Ubeda et al., 1983]. Le ricerche che si sono concentrate sulla relazione tra campi ELF e dinamica di sviluppo non sono numerose, tuttavia permettono di definire il ritardo come un effetto generalizzato, in quanto dimostrato in differenti Classi animali. Difatti, Cameron rilevò la presenza di ritardo di sviluppo non accompagnato da malformazioni nel pesce *Oryzias latipes* e Zimmerman in uova di riccio di mare, dopo l'esposizione ad un campo magnetico a 60 Hz e 100 μ T [Cameron et al., 1985; Zimmerman et al., 1990]. Zusman osservò effetti teratologici e ritardo di sviluppo in embrioni di ratto esposti a differenti campi ELF [Zusman et al., 1990].

In questo ambito si colloca il lavoro di Severini e collaboratori [2003] dal titolo '*Sublethal effect of a weak intermittent magnetic field on the development of Xenopus laevis (Daudin) tadpoles*'. In questo articolo il Gruppo di Ricerca di Bioclimatologia a cui appartengo (dell'Università degli Studi 'La Sapienza' di Roma prima ed ora dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo) diretto dal Prof. Maurizio Severini ha dimostrato, con una procedura sperimentale e su un modello biologico che io stessa avevo già adottato nella mia Tesi di Laurea in Scienze Ambientali [Alilla, 2001], che il campo emesso da un televisore (ampiezza inferiore a 25 μ T) provoca in coorti di *Xenopus laevis* nello stadio larvale, un ritardo di sviluppo significativo, senza dare luogo a mortalità e malformazioni. In questo lavoro, in tre differenti ripetizioni coorti di 100 girini di *X. laevis* erano esposte al campo magnetico 'a dente di sega' emesso da un apparecchio televisivo (armonica principale: 50 Hz, 20 μ T). L'esposizione prolungata durante l'intera vita larvale (circa 50 giorni) ritardava la metamorfosi dei girini di 5 giorni (in media circa il 10%). Come è noto, la forma d'onda 'a dente di sega' è costituita dalla sovrapposizione di

differenti armoniche, pertanto è stato impossibile per gli Autori determinare la specifica combinazione (o combinazioni) di frequenza e ampiezza responsabili del ritardo osservato. Pertanto, nell'ambito del mio Dottorato di Ricerca ho in primo luogo pensato di consolidare i risultati ottenuti da Severini, determinando se il campo magnetico a 50 Hz giocasse un ruolo e se la sua intensità fosse implicata nel ritardo osservato.

In questo senso ho effettuato durante i primi due anni della mia ricerca di Dottorato due serie di esperimenti costituite ciascuna da tre ripetizioni in cui le coorti di girini venivano esposte ad un campo magnetico a due combinazioni di frequenza e intensità differenti (50 Hz, 71.1 μ T rms; 50 Hz, 73.7 μ T rms). Per fare ciò abbiamo dovuto progettare e realizzare appositamente un solenoide nel quale è stato possibile impostare i parametri del campo a cui esporre gli animali.

Dalla prima serie di esperimenti è stato elaborato un articolo al momento sottoposto a revisione da parte della rivista International Journal of Radiation Biology, dal titolo '*Metamorphosis delay in *Xenopus laevis* (Daudin) tadpoles exposed to two 50 Hz magnetic fields of different amplitudes*' [Severini et al., in review] di cui sono coautrice. I risultati di questi esperimenti confermano che il campo magnetico a 50 Hz produce ritardo di sviluppo in girini di *Xenopus laevis*, mettendo in luce un effetto soglia in ampiezza.

Nella seconda serie di esperimenti sono state impiegate le medesime combinazioni di ampiezza e frequenza in condizioni di Risonanza di Ciclotrone dello ione Calcio. La teoria della risonanza di ciclotrone spiega la frequenza di rotazione di una carica attorno ad un campo magnetico statico nel vuoto (Appendice A). Sebbene la teoria sia stata dimostrata unicamente nel vuoto, alcune ricerche riportano di effetti sulla materia sia biologica sia inorganica (rispettivamente [Smith et al., 1987; Zhadin et al., 1998]) di campi alla frequenza di risonanza del Ca^{2+} . Solo di recente Del Giudice e Preparata hanno fornito una spiegazione del fenomeno chiarendo che essa è valida anche nella materia sulla base della Teoria dell'Elettrodinamica Quantistica (Appendice B) [Del Giudice et al., 2002]. Anche questa seconda serie di esperimenti ha evidenziato un ritardo di sviluppo, sebbene in condizioni di risonanza esso risulti di minore entità rispetto a quello ottenuto in precedenza.

Nell'intento di ricercare un possibile meccanismo che spiegasse come il campo magnetico interagisca con lo sviluppo, seguendo il consiglio del Prof. Franz Halberg dell'Università del Minnesota (ritenuto dalla comunità scientifica il 'padre' della Cronobiologia), nella seconda parte del mio Dottorato di Ricerca ho concentrato la mia attenzione sul ruolo della melatonina e sul suo ritmo circadiano di sintesi. Quest'ormone

infatti viene generalmente considerato target biologico dei campi elettromagnetici [Reiter, 1998]. E' noto inoltre che la melatonina, negli Anfibi, agisce come regolatore endocrino dello sviluppo in qualità di antagonista dell'ormone tiroideo, che né è il principale promotore [Wright, 2002]. I livelli plasmatici di melatonina, contrariamente a quelli dell'ormone tiroideo si mantengono elevati durante la premetamorfosi (la fase iniziale della vita larvale) e si riducono fortemente all'approssimarsi del climax (un effetto indotto dalla tiroxina [Wright & Alves, 2001]), per poi elevarsi di nuovo a metamorfosi conclusa. Per quanto riguarda l'anuro *Xenopus laevis*, modello biologico utilizzato in questa sperimentazione, è stato dimostrato in vitro un ciclo circadiano di sintesi della melatonina nell'epifisi e nella retina all'inizio della morfogenesi (stadio 26 secondo [Nieuwkoop & Faber, 1956]) ed all'inizio della vita larvale (stadio 47) [Green et al., 1999], mentre non è stato finora determinato il comportamento dell'ormone negli stadi prossimi alla metamorfosi. Pertanto durante l'ultimo anno di Dottorato ho eseguito due esperimenti volti a determinare la presenza di un andamento circadiano di sintesi della melatonina nella retina di *Xenopus* negli stadi prometamorfici (stadi 55-56) ed una eventuale alterazione indotta dal campo magnetico emesso da un apparecchio televisivo. La scelta di detta sorgente nasce da tre considerazioni principali: in primo luogo la maggiore probabilità di ottenere un risultato utilizzando la sorgente che in precedenza aveva prodotto il ritardo di sviluppo più rilevante [Severini et al., 2003]; in secondo, la possibilità di verificare sperimentalmente su un modello biologico i risultati di un lavoro recente, in cui si è rivelata una diminuzione significativa del contenuto di melatonina nell'urina di bambini in età scolare esposti alla TV [Salti et al., 2006]; infine, la consapevolezza che il rischio di danno biologico a causa dei campi magnetici ELF, dipende sia dai parametri del campo che dalla probabilità che ha un sistema biologico di esservi esposto, ed il televisore è senza dubbio una sorgente ampiamente diffusa tra la popolazione che spesso vi si espone in maniera prolungata. Le analisi condotte evidenziano ancora una volta che il campo magnetico a bassa frequenza causa ritardo di sviluppo in coorti di *Xenopus laevis*, non alterando in maniera significativa i livelli della melatonina retinica. Particolarmente interessante è stato notare che la sintesi della melatonina retinica presenta un ritmo circadiano anche in stadi prossimi alla metamorfosi.

1 EFFETTI BIOLOGICI DEI CAMPI ELETTROMAGNETICI

1.1 Radiazione e campi elettromagnetici

La radiazione è energia che si sposta nello spazio (vuoto) sotto forma di onde elettromagnetiche. Le onde elettromagnetiche sono generate da cariche elettriche, le quali costituiscono la materia ed oscillano per effetto dell'agitazione termica. Il differente grado di oscillazione delle cariche determina la diversità delle onde elettromagnetiche emesse dai corpi. Viene definita onda monocromatica quella onda elettromagnetica generata da una carica che oscilla in modo armonico (con periodo³ costante). Essendo la materia composta di numerosissime cariche oscillanti, ognuna con un proprio periodo, viene definita **radiazione** la sovrapposizione delle onde elettromagnetiche che deriva dall'emissione di queste cariche. Le onde elettromagnetiche sono determinate da una concatenazione di campo elettrico E e di campo magnetico B perpendicolari tra loro, che si propagano nello spazio.

Il **campo elettrico** E è un campo vettoriale, cioè una distribuzione nello spazio di vettori ognuno per ogni punto che circonda un oggetto carico (es. particella carica). L'intensità del campo elettrico E , è la forza per unità di carica esercitata su una carica elettrica puntiforme e si misura in Volt per metro [V/m].

Il **campo magnetico** B è anch'esso un campo vettoriale che viene prodotto nello spazio dalla presenza di un magnete o da un conduttore di corrente elettrica. L'intensità del campo magnetico H , è la forza esercitata su un polo magnetico unitario, ovvero su un elemento unitario di corrente elettrica; la sua unità di misura è Ampere per metro [A/m]. Per campi magnetici generati da correnti che passano attraverso un conduttore si usa invece un'altra grandezza: l'induzione magnetica (B), data dal prodotto dell'intensità di campo magnetico H per la permeabilità magnetica del mezzo (m) che dipende dal mezzo stesso. La sua unità di misura è Tesla [T]. Le radiazioni elettromagnetiche sono suddivise in due principali gruppi in relazione all'interazione con la materia biologica: le Radiazioni Ionizzanti (IR- Ionizing Radiation), che possiedono energia superiore a 12 eV necessaria per ionizzare l'atomo di idrogeno; e le Radiazioni Non Ionizzanti (NIR– Non Ionizing

³ Intervallo di tempo tra due massimi o due minimi dell'onda.

Radiation), che hanno un'energia associata non sufficiente ad indurre nella materia il fenomeno della ionizzazione.

1.2 Evidenze sperimentali degli effetti biologici dei campi elettromagnetici

Le radiazioni non ionizzanti, come detto, non sono in grado di ionizzare le molecole biologiche, nonostante ciò ad esse vengono comunemente associati effetti biologici termici e non termici. I primi, normalmente causati da esposizioni brevi ma intense, sono dovuti all'assorbimento di energia ed al conseguente aumento della temperatura nel tessuto biologico irradiato. L'energia che viene dissipata dipende principalmente dall'intensità del campo e dalla conducibilità del tessuto stesso. Gli effetti non termici sono rappresentati da alterazioni biologiche in assenza di incremento apprezzabile di temperatura. Essi sono dovuti ad interazioni con strutture molecolari, ma rimangono ancora da chiarire i meccanismi d'azione che determinano tali effetti.

Alle radiazioni non ionizzanti appartengono le bande di frequenza⁴ ELF (Extremely Low Frequency: 3-300 Hz) e le VLF (Very Low Frequency: 300-3000 Hz), queste sono generate da apparecchiature o cavi elettrici in ambienti domestici, dalle linee di trasmissione elettrica a 50 Hz, oppure nelle vicinanze delle linee o dei trasformatori ad alta tensione. Per queste radiazioni caratterizzate da bassa frequenza, il campo elettrico ed il campo magnetico si comportano come grandezze indipendenti tra loro [Ptitsyna et al., 1998]. Nell'interazione con gli organismi il fattore determinante, tra i due, è però il campo magnetico che, a differenza di quello elettrico, non subisce attenuazione quando penetra in un sistema biologico.

Il primo lavoro in cui si avanzava l'ipotesi della possibile esistenza di una associazione tra la residenza nei pressi di grandi elettrodotti e l'insorgere di gravi patologie infantili, come la leucemia risale al 1979 [Wertheimer & Leeper, 1979]. Studi degli anni '80 hanno di fatto confermato nella maggior parte dei casi questa prima indicazione evidenziando associazioni con altre forme tumorali, tanto nell'adulto quanto nel bambino [Savitz et al., 1988; Tomenius, 1986; London et al., 1991]. Le ricerche più recenti hanno consentito di escludere un'associazione significativa tra esposizione ai campi ELF e numerosi tipi di tumori nell'adulto [Lin and Lu, 1989; Myers et al., 1989; Feychting & Ahlbom, 1994; Fulton et al., 1980] mentre resta dubbia quella con i tumori cerebrali

⁴ Numero di oscillazioni dell'onda elettromagnetica effettuate in un secondo.

[Vecchia, 1997; Kheifets, 2001; Kheifets et al., 1999; Cocco et al., 1998], mammari [Cocco et al., 1999], e alquanto controversa quella con le leucemie infantili e i linfomi degli adulti esposti per motivi professionali [Kliukiene et al., 1999; Severson et al., 1988; Youngson et al., 1991]. La bontà delle conclusioni di alcune di queste ricerche è stata inficiata però dall'impiego di campioni inadeguati, dall'acquisizione indiretta dei dati concernenti l'emissione elettromagnetica e dalla limitata significatività statistica dei risultati.

Per quanto riguarda le evidenze sperimentali *in vitro* le ricerche si sono concentrate sui possibili effetti a livello di proliferazione cellulare, dei flussi ionici attraverso la membrana cellulare e del corredo cromosomico. Nel primo caso i risultati degli studi non permettono di confermare un effetto riproducibile e ben definito, ma suggeriscono che la natura della stimolazione (inibizione o promozione) dipende dalla frequenza e dall'ampiezza del campo applicato [Kwee & Raskmark, 1995; Kula & Drozd, 1996; Paile et al. 1995; Scarfi et al., 1999] e che l'effetto è significativo nelle cellule in replicazione attiva. Nel secondo caso è stato dimostrato che campi magnetici inducono variazioni del flusso dello ione calcio in dipendenza del tipo cellulare studiato e dell'intensità del campo applicato [Farndale et al., 1987; Walleczek & Liburdy, 1990]. Infine, nel terzo si ritiene improbabile che i campi elettromagnetici di bassa frequenza siano in grado di indurre alterazioni del DNA tali da risultare mutageniche [McCann et al., 1993; McCann et al., 1998; Murphy et al., 1993; Verschaeve, 1995; Juutilainen & Lang, 1997]. I risultati delle ricerche *in vitro* sono in alcuni casi contrastanti e gli esperimenti difficilmente riproducibili a causa di differenze nei modelli biologici usati e nelle sorgenti di campi ELF e VLF impiegate. Inoltre, spesso i risultati si riferiscono ad esposizioni a campi magnetici di ampiezza superiore ai 100 μ T, limite imposto dalla normativa italiana (DPCM 8 Luglio 2003) per esposizioni prolungate a campi a 50 Hz generati dagli elettrodotti.

Nell'ambito delle ricerche condotte *in vivo* nel lavoro di Delgado e colleghi [1982] si rivelarono significative malformazioni in embrioni di pollo esposti ad un debole campo magnetico ($< 10 \mu$ T) ELF generato da una bobina di Helmholtz. Negli anni successivi questo esperimento fu più volte replicato ed i risultati ottenuti, da gruppi di ricerca differenti, a volte confermarono [Ubeda et al., 1983, 1994; Juutilainen and Saali, 1986; Martin, 1992; Koch et al., 1993], ed altre confutarono quanto osservato da Delgado [Maffeo et al., 1984; Sandstrom et al., 1986; Siskin et al., 1986]. I controversi risultati sono imputabili da un lato all'impiego di un modello biologico non standard (embrioni di

pollo allevati in batteria) e dall'altro all'utilizzo di sorgenti di campo non equivalenti. Infine, con un esperimento su ben 2500 embrioni di pollo si ottenne in maniera definitiva la conferma dei risultati di Delgado [Farrel et al., 1997]. Di fatto, in quest'ultimo caso venne impiegata una bobina di Helmutz quale sorgente del campo, come per Delgado. Nel lavoro di [Youbicier-Simo et al., 1997] per ripetere l'esperimento di Delgado venne utilizzato, per la prima volta, come sorgente di onde elettromagnetiche un apparecchio televisivo.

1.2.1 Ritardo di sviluppo

Nel 1983, Ubeda e colleghi misero in evidenza che due campi magnetici di stessa frequenza (100 Hz) e differenti ampiezze (1 μT and 13.9 μT) causavano effetti diversi su embrioni di pollo. I risultati mostravano presenza ed assenza di malformazioni rispettivamente in corrispondenza del campo più debole e di quello più forte. Non solo, ma i campi sembravano agire nel contempo anche sul tasso di sviluppo. In particolare, il campo d'intensità maggiore produceva ritardo di sviluppo negli embrioni di pollo esposti [Ubeda et al. 1983]. Questo è il primo lavoro, di mia conoscenza, in cui si verifica la presenza di un ritardo di sviluppo correlabile all'esposizione a campi ELF, sebbene sia trattato in tono minore come 'effetto secondario' superato in importanza dalla presenza di malformazioni.

In seguito, Cameron e colleghi [1985] pubblicarono i risultati di un loro esperimento in cui le uova del pesce *Oryzias latipes* esposte ad un campo magnetico di 60 Hz e 100 μT presentavano un ritardo di sviluppo rispetto ai gruppi di controllo di 18 h; unendo al campo magnetico un debole campo elettrico alternato di 60 Hz il ritardo si riduceva a circa 5 h ed in presenza del solo campo elettrico non si aveva alcun effetto. Questo permise loro di affermare che la componente magnetica del campo fosse la causa del ritardo [Cameron et al., 1985], come del resto viene evidenziato negli esperimenti di questa ricerca. In embrioni di echinodermi (*Strongylocentrotus purpuratus*) l'esposizione prolungata ad un campo magnetico sempre di 60 Hz e 100 μT ha causato dopo 23 h dalla fecondazione un ritardo di sviluppo altamente significativo di circa 1h [Zimmermann et al., 1990]. Nell'analizzare i possibili meccanismi di azione del campo magnetico gli Autori misero in evidenza il ruolo del calcio intracellulare, le cui variazioni è noto possano stimolare o sopprimere gli eventi mitotici [Silver & Inoue, 1987; Wolniak, 1988] ed il cui efflusso viene modificato in dipendenza del tipo cellulare studiato e dell'intensità del campo applicato [Blackman et al., 1985; Farndale et al., 1987; Adey, 1988; Walleczek &

Liburdy, 1990]. E' stato osservato inoltre che nei ratti, un debole campo elettromagnetico impulsivo produce un ritardo significativo dell'apertura degli occhi di 1,4 giorni [Zusman et al., 1990]. Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato, che la frequenza del campo applicato risulta essere un parametro decisivo nel discriminare l'entità degli effetti sullo sviluppo embrionale, testimoniando l'esistenza di un "effetto finestra" [Adey, 1979].

Infine, Severini e colleghi hanno dimostrato che il campo magnetico emesso da un apparecchio televisivo (frequenza 50 Hz; ampiezza $<20\mu\text{T}$) produce un ritardo nel raggiungimento della metamorfosi altamente significativo di circa 5 giorni da parte di coorti di girini di *Xenopus laevis* [Severini et al., 2003]. Alla luce di quanto esposto è ragionevole considerare il ritardo di sviluppo come un effetto dei campi ELF generalizzato considerando le evidenze sperimentali ottenute in differenti Classi animali.

1.2.2 Effetti alla frequenza di risonanza di ciclotrone

In una rassegna pubblicata dieci anni fa [Shimizu et al., 1995] sull'insieme delle evidenze sperimentali presenti nella letteratura internazionale, si riportava che: la superficie esterna della membrana cellulare costituisce presumibilmente il target primario delle interazioni tra campi ELF e cellule viventi. Simkò e Mattsson [2004] hanno confermato di recente questa tesi. Numerosi studi hanno indagato le interazioni tra le radiazioni ELF ed i flussi degli ioni attraverso la membrana cellulare, in particolare dello ione calcio [Liburdy et al., 1993; Lindström et al., 1993; Löschinger et al., 1999; Mattsson et al., 2001] il più studiato in quanto attivatore dell'AMP ciclico, molecola chiave nell'attivazione dei processi metabolici intracellulari. E' stato dimostrato che campi magnetici pulsati inducono variazioni del flusso di questo ione (Ca^{2+}) in dipendenza del tipo cellulare studiato e dell'intensità del campo applicato [Fernandale et al., 1987; Walleczek & Liburdy, 1990]. A questo riguardo, sono stati proposti diversi modelli che spiegano i meccanismi d'azione degli ELF al livello del flusso ionico transmembrana: sulla base dell'effetto Hall [Balcavage et al., 1996], sull'induzione da parte dei campi di vibrazioni forzate [Panagoupolos et al., 2000-2002], ed infine un meccanismo basato sulla teoria della frequenza di risonanza di ciclotrone (Ion-Cyclotron-Resonance- ICR) (Appendice A) [Liboff, 1985; Liboff et al., 1987].

Nel 1974 Adey analizzò in vitro il flusso dello ione calcio Ca^{2+} nel cervello di pulcino esposto ad un campo elettrico sinusoidale (5-56 V/m) [Kaczmarek & Adey, 1974]. Gli esperimenti indicavano una variazione significativa dell'efflusso di ioni calcio solamente per determinate frequenze (6 e 16 Hz) e per particolari valori del campo (10 e 56

V/m). L'effetto di non linearità, denominato "effetto finestra" presentava un andamento a campana, con il picco di massimo efflusso dello ione per una frequenza di modulazione di 16 Hz. L'effetto non si manifestava applicando campi continui di alta frequenza. Blackman, da evidenze sperimentali, concluse che nel rilascio degli ioni calcio del tessuto cerebrale dei pulcini è implicata la debolissima componente magnetica del campo elettrico nell'intervallo di frequenza ELF e che le finestre in frequenza, che determinano la risposta biologica, dipendono dall'intensità del campo geomagnetico locale statico [Blackman et al., 1985]. Gli esperimenti di laboratorio permisero di determinare una relazione che legava la frequenza del campo magnetico alternato con la frequenza di ciclotrone f_c (Appendice A) dello ione calcio in cui B_0 è l'intensità del campo geomagnetico statico. Liboff nell'85 [Liboff, 1985] spiegò il fenomeno del cambiamento di concentrazione dello ione Ca^{2+} supponendo che il campo magnetico statico fosse in grado di causare una rotazione dello ione intorno alle linee di campo mentre l'azione del campo alternato fosse quella di accelerarlo. Tuttavia, la rotazione dello ione alla frequenza di risonanza di ciclotrone (valida nel vuoto) non si osserva nella materia biologica (mezzo molto denso e di alta resistività) a causa delle collisioni con le altre molecole presenti nello spazio circostante e della 'piccola' energia ad essa associata (effetto KT) [Adair, 1991]. La teoria fu modificata successivamente supponendo che il moto di tali ioni avvenisse nei canali del calcio nei quali fosse possibile ipotizzare il vuoto e quindi ovviare al suddetto problema [Liboff et al., 1987]. Zadhin e colleghi [Zadhin et al., 1998] pensarono di superare il problema servendosi di un sistema non biologico molto semplice e di un apparato sperimentale facilmente riproducibile. La sua esperienza dimostra che, in una soluzione elettrolitica (acido glutammico) esposta al campo B_0 la sovrapposizione di un debole campo magnetico di frequenza f_c dell'acido, parallelo al primo, promuove un aumento del flusso dell'elettrolita, determinando impulsi di corrente di 10 nA della durata di 20 s. Nonostante il buon accordo tra i risultati sperimentali e la formula della frequenza di ciclotrone degli ioni, il verificarsi della risonanza di ciclotrone in una soluzione acquosa è però considerata impossibile a causa della presenza dell'effetto KT, per il quale il "rumore termico" risulta molto maggiore dalla debole energia associata al campo magnetico applicato [Adair, 1991]. Recentemente, Del Giudice e Preparata hanno fornito una spiegazione definitiva del fenomeno che si basa sulla Teoria dell'Elettrodinamica Quantistica (Appendice B) [Del Giudice et al., 2002]. Dato che è stato dimostrato che in cellule di ratto la sintesi di melatonina pineale è depressa da deboli campi ELF alla frequenza di risonanza di

ciclotrone [Lerchl et al., 1991], nell'ambito della mia ricerca è di particolare interesse chiarire il ruolo il flusso di questi ione sulla sintesi della melatonina.

L'influenza della concentrazione intracellulare dello ione ($[Ca^{2+}]_i$) nell'epifisi è stata chiarita in maniera esaustiva nei Mammiferi [Meyer et al., 1986; Sudgen, 1989; Morton et al., 1989; Santana et al., 2001], negli Uccelli [Zatz & Mullen, 1988; Zatz, 1989; Nikaido & Takahashi, 1996; Shimizu et al., 2003] e nei Pesci [Gasser & Gern, 1997]. L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ incrementa la sintesi di melatonina, attivando l'AMP ciclico i cui livelli mantengono elevata l'attività catalitica dei due enzimi che costituiscono i siti di regolazione della sintesi della melatonina dal triptofano: N-Acetiltransferasi (NAT sito principale) e idrossimetiltransferasi (HIOMT sito accessorio). Harrison e Zatz [1989] precisarono che è il flusso di calcio attraverso i canali a controllo voltaico a regolare la sintesi della melatonina.

1.2.3 Melatonin hypothesis

Stevens nel 1996 formulò la “melatonin hypothesis”, per la quale i campi elettromagnetici ELF riducono i livelli di melatonina promuovendo lo sviluppo di carcinomi. In effetti è stato provato che l'alterazione dei livelli di melatonina può interagire con lo sviluppo di alcuni tipi di cancro negli animali, incluso il carcinoma mammario, il cancro alla prostata ed il melanoma [Blask, 1993]. Per interpretare queste osservazioni si è ipotizzato che la melatonina da un lato riduca lo sviluppo ed il turnover delle cellule mammarie a rischio di trasformazione maligna e dall'altro agisca direttamente come oncostatico [Stevens, 1993]. Il primo lavoro in cui si evidenziò la risposta della ghiandola pineale (sede di sintesi della melatonina) ad un campo elettromagnetico artificiale è dei primi anni '80. Semm e colleghi osservarono una riduzione dell'attività elettrica delle cellule pineali esposte ad un campo magnetico statico [Semm et al., 1980]. L'anno successivo venne pubblicato un lavoro in cui l'esposizione di ratti ad un campo elettrico a 60 Hz sopprimeva le normale crescita nella produzione notturna di melatonina pineale [Wilson et al., 1980]. Da allora diversi articoli riportarono che la melatonina può essere ridotta da campi elettrici variabili [Reiter et al., 1988], da rapide variazioni di campo statico [Welker et al., 1983; Olcese & Reuss, 1986; Stehle et al., 1988; Lerchl et al., 1991], da campi magnetici variabili [Kato et al., 1993; Yellon, 1994; Loscher et al., 1994]. È stato sperimentato che anche campi magnetici di 1 μ T sono in grado di ridurre la melatonina nei ratti [Kato et al., 1993; Loscher et al., 1994]. Tuttavia alcune sperimentazioni non hanno evidenziato effetti [Sasser et al., 1992; Lee et al., 1993;

McCormick et al., 1994]. Stevens e Davis [1996] spiegano che le differenze osservate nei diversi lavori sperimentali sono da imputare a reali differenze nei campi, nei sistemi espositivi impiegati e nella variabilità biologica dei modelli animali utilizzati.

2. CONCETTI DI BASE DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI BIOLOGICHE

2.1 Definizioni

Un **sistema** è l'intervallo spazio-temporale a cui ci si interessa ad una qualsiasi scala. Un sistema è individuato da una *frontiera*, la superficie chiusa reale o ideale che racchiude il sistema (es. membrana cellulare, confine di uno Stato) e che lo distingue dall'*ambiente esterno* (il non- sistema). La frontiera di un sistema è attraversata dai *flussi* di materia [misurati in Kgs^{-1}] o energia [Js^{-1}] che entrano nel o escono dal sistema nell'unità di tempo e costituiscono le componenti che il sistema scambia con l'ambiente esterno.

Un sistema si dice **aperto** se la sua frontiera è attraversata da flussi di materia e di energia (la maggior parte dei sistemi naturali appartengono a questa categoria, tra cui i sistemi viventi), si dice **chiuso** se la frontiera è attraversata solo da flussi d'energia (sono pochi, tra questi il pianeta Terra), si dice **isolato** se non è attraversata da nessun flusso (non esistono sono astrazioni).

I sistemi fisici si suddividono in deterministici, stocastici ed imprevedibili. I sistemi **deterministici** possiedono una sola linea evolutiva possibile e per essi valgono le leggi della Fisica Classica; quelli **stocastici** presentano un numero finito (limitato) di linee evolutive possibili e sono oggetto di studio della Statistica; gli **imprevedibili**, in ultimo, hanno un numero infinito (o illimitato) di linee evolutive possibili e sono i sistemi studiati dalla Biologia).

I sistemi viventi sono sistemi naturali particolari che si distinguono dai non viventi per alcune caratteristiche peculiari in quanto sono in grado di accrescersi, riprodursi ed evolversi.

Il **sistema vivente** viene definito da Ageno come un sistema chimico, coerente, dotato di programma [Ageno, 1994]. Queste caratteristiche denotano innanzitutto che al suo interno si verificano reazioni chimiche (chimico), che tali reazioni avvengono in maniera ordinata e ripetibile (coerente) e che ciascun sistema vivente possiede un sistema di controllo (dotato di programma, codificato nel DNA). Il fatto che il sistema vivente sia dotato di coerenza richiede che debba spendere energia per mantenere la successione

ordinata nello spazio e nel tempo delle reazioni chimiche che avvengono in esso, per cui il sistema deve trarre in qualche modo questa energia dall'ambiente. In questo senso si distinguono due categorie di sistemi viventi: gli autotrofi e gli eterotrofi. I primi (cianobatteri, alghe, piante) sono in grado di utilizzare l'energia solare nel processo fotosintetico per creare carboidrati costituiti da legami chimici che forniscono loro l'energia necessaria. I secondi (protozoi, animali, uomo) devono invece ingerire dall'esterno le macromolecole necessarie per il loro sostentamento e per il mantenimento dell'ordine interno.

La caratteristica primaria del sistema di avere al suo interno un programma, gli consente da un lato di avere memoria dell'ordine delle reazioni e di essere in grado, quindi, di far fronte alle eventuali perturbazioni. Dall'altro il programma è unico e quindi ciascun sistema vivente possiede il proprio (DNA), ciò significa che individui della stessa specie di possiedono tra loro un programma differente (variabilità genetica).

A tutt'oggi non si ha una definizione di specie univocamente accettata, quella generalmente riportata nei testi di biologia evolutiva considera una **specie** come un gruppo di individui interfertili in grado di generare prole fertile [Dobzhansky, 1937; Mayr, 1942]. Questa definizione essenzialmente *biologica*, sebbene molto accreditata non tiene conto delle specie con riproduzione non sessuata. In *ecologia* si definisce una specie come l'insieme di individui che condividono la medesima nicchia ecologica. In *genetica* una specie è l'insieme dei viventi che presentano geni nelle stesse locazioni del DNA. Quest'ultima definizione è particolarmente interessante perché fa esplicitamente riferimento ad una proprietà fondamentale del sistema vivente (il programma). Sulla base della definizione genetica i viventi di specie diverse sono diversi tra loro perché hanno molecole di DNA di lunghezza diversa, un differente numero di geni che pur codificando per le stesse proteine (o proteine simili) hanno locazioni diverse. I viventi di una stessa specie possiedono DNA di stessa lunghezza, lo stesso numero di geni e gli stessi geni nelle stesse locazioni, che però si esprimono in maniera diversa (alleli).

2.2 Il vivente come sistema fisico

La presenza di un programma fa dei sistemi viventi una categoria di sistemi fisici particolari.

Infatti, mentre un sistema fisico tradizionale (classico o quantistico) si evolve (cioè cambia nel tempo) in funzione delle condizioni iniziali e di quelle al contorno, la dinamica di un sistema fisico vivente (sistema vivente) è funzione delle:

- a) condizioni iniziali
- b) condizioni al contorno esterne
- c) condizioni al contorno interne

Le condizioni iniziali intervengono al momento in cui si forma la cellula uovo. Le condizioni al contorno esterne sono determinate dalle caratteristiche dell'ambiente fisico (microclima), chimico (molecole circostanti) e biologico (competitori, parassiti, predatori) esterne al sistema vivente. Quelle al contorno interne sono indipendenti da quelle esterne (tranne nei casi di radiazioni ionizzanti, molecole tossiche) ed una volta stabilite al momento della formazione della cellula uovo, restano invariate nel corso dell'intera vita del sistema. L'esistenza di quest'ultima condizione dà un grado di libertà in più ai sistemi viventi rispetto ai sistemi fisici (non viventi): la *vita* (condizione al contorno interna). Questa condizione dà luogo ad una complessità elevatissima, che, associata alla variabilità microclimatica (condizione al contorno esterna), rende irripetibile ed imprevedibile (oltre che irreversibile) l'evoluzione di un sistema vivente.

La particolarità dei sistemi viventi è che avendo un numero infinito di linee evolutive non è possibile ripetere gli esperimenti più di infinite volte per stabilire la probabilità di ciascuna linea evolutiva. Inoltre, a causa dell'irreversibilità dello sviluppo di un sistema vivente, non è possibile ripetere un esperimento neppure due volte con lo stesso sistema.

Per studiare un sistema vivente con i metodi della fisica, si ipotizza che i sistemi viventi, in generale imprevedibili, siano prevedibili nella fase incipiente [Ageno, 1994]. Come una moneta (sistema stocastico dal lancio al risultato) può essere considerato un sistema deterministico nel primo millisecondo dopo il lancio, così un sistema vivente (sistema imprevedibile nell'arco del ciclo vitale) può comportarsi da sistema stocastico in un intervallo di tempo abbastanza breve dopo la nascita (sviluppo incipiente). Con il termine **sviluppo incipiente** si identifica la fase che segue immediatamente la nascita, quando le condizioni iniziali controllano l'evoluzione di un sistema vivente più attivamente delle condizioni al contorno esterne (e, conseguentemente, le condizioni al controllo interne variano poco), allora il sistema può svilupparsi come un sistema stocastico (ma non deterministico, a causa della variabilità genetica). Durante la fase incipiente, pertanto, ci si può aspettare la ripetibilità degli esperimenti. Tuttavia nemmeno in questa fase l'evoluzione del sistema è reversibile e gli esperimenti ripetuti debbono essere necessariamente condotti su individui *considerati* uguali (sistemi viventi simili, cioè appartenenti alla stessa specie, o sub-specie).

In esperimenti di laboratorio si ha la possibilità di controllare il microclima (temperatura, umidità, pressione ecc... che rappresentano le condizioni al contorno esterne) in cui un individuo si sviluppa, consente di annullare un grado di libertà del sistema facendo rimanere la variabilità genetica quale unica condizione al contorno (interna). In queste condizioni, allora il sistema vivente può considerarsi al pari di un sistema stocastico e la sua evoluzione può essere vista in termini probabilistici [Curry & Feldmann, 1987].

2.3 L'evoluzione dei Modelli di Dinamica di Popolazione

Si definisce **popolazione biologica** un insieme di viventi della stessa specie che condividono lo stesso intervallo spazio-temporale [Ricklefs, 1976] e la **coorte** come l'insieme di individui di una popolazione che nel medesimo tempo si trovano nello stesso stadio di sviluppo, ad esempio gli individui nati contemporaneamente.

Dalla fine del diciottesimo secolo, sono stati elaborati differenti modelli⁵ demografici⁶ per descrivere la dinamica delle popolazioni biologiche sempre più complessi ed aderenti alla realtà che si pregiavano di rappresentare.

L'equazione fondamentale delle popolazioni, o **equazione di conservazione**, è la seguente:

$$\frac{dN(t)}{dt} = R_B(t) + R_I(t) - R_D(t) - R_E(t)$$

in cui la variazione della densità di popolazione $N(t)$ nel tempo dipende dai flussi di natalità immigrazione mortalità ed emigrazione indicati rispettivamente con i pedici B, I, D, E dall'inglese Birth, Input, Death ed Exit. Generalmente nei modelli di simulazione si opera una semplificazione considerando una **popolazione chiusa**, in cui i flussi di immigrazione ed emigrazione sono entrambi nulli.

Malthus [1798] fu il primo a costruire un modello e ad esplicitare i flussi di natalità e mortalità, definendo la variazione della densità di popolazione in un intervallo di tempo pari alla differenza tra gli individui nati e quelli morti nello stesso intervallo:

$$\frac{dN(t)}{dt} = B \cdot N(t) - D \cdot N(t)$$

⁵ Descrizione semplificata e finalizzata della realtà a cui si riferisce.

⁶ Simulano la densità di popolazione nel tempo.

dove B e D indicano rispettivamente il tasso di natalità e di mortalità (costanti) della popolazione. Questo modello dà per B maggiore (o minore) di D una popolazione che aumenta (o diminuisce) esponenzialmente nel tempo.

In seguito Verhulst [1845] Pearl [1925] perfezionarono questo primo modello non considerando più i parametri B e D come costanti, ma variabili e dipendenti dalla densità di popolazione:

$$\frac{dN(t)}{dt} = S \left[1 - \frac{N(t)}{C} \right] \cdot N(t)$$

Questa equazione, nota come Equazione Logistica, presenta due parametri caratteristici della popolazione C ed S , che possono essere determinati sperimentalmente. Il modello logistico supera l'assunzione malthusiana per cui la densità di popolazione non cresce più indefinitamente, ma presenta un asintoto determinato dalla disponibilità di risorse dell'ambiente. Tuttavia, esso non tiene conto delle interazioni della popolazione-studio con le altre presenti nell'ambiente. Tra i modelli elaborati per simulare popolazioni tra loro interagenti si annovera il cosiddetto modello preda-predatore, proposto indipendentemente da Lotka [1925] e Volterra [1926].

$$\begin{cases} \frac{dN_1(t)}{dt} = [S_1 - Q_1 \cdot N_2(t)] \cdot N_1(t) \\ \frac{dN_2(t)}{dt} = [-S_2 + Q_2 \cdot N_1(t)] \cdot N_2(t) \end{cases}$$

Il sistema presenta due equazioni in due incognite $N_1(t)$ (densità della popolazione di prede) ed $N_2(t)$ (densità della popolazione di predatori). S_1 ed S_2 sono due costanti che dipendono dai tassi di natalità e di mortalità rispettivamente delle prede e dei predatori, Q_1 e Q_2 indicano invece l'azione (pressione) di una popolazione sull'altra. Risolvendo il sistema si ottiene che le popolazioni non si estinguono mai ed ognuna oscilla intorno ad un valore medio di densità che dipende dall'interazione con l'altra.

L'esperienza mostra che l'andamento esponenziale previsto dal modello di Malthus, quello logistico previsto dal modello di Verhulst e quello oscillante previsto da Volterra sono verificati rigorosamente solo nelle **popolazioni unicellulari** (batteri, alghe e funghi) che si sviluppano in laboratorio in condizioni (fortemente) controllate. Il motivo di ciò è che l'ipotesi di questi primi tre modelli, per cui gli individui di una qualsiasi popolazione biologica sono tutti uguali tra loro, non corrisponde alla realtà. Infatti le popolazioni di organismi superiori presentano struttura d'età, in quanto gli individui sono

simili ma non uguali tra loro e, relativamente ai nostri scopi, si sviluppano in tempi diversi (sono sistemi stocastici).

2.3.1 Dinamica di popolazioni strutturate

In una popolazione **strutturata**, i parametri che la caratterizzano (tassi di natalità, di mortalità, efficienza riproduttiva ecc...) dipendono fortemente dalla distribuzione degli individui in classi d'età. Nello sviluppo dei modelli di popolazioni con struttura d'età è stato fondamentale il contributo di McKendrick [1926] e Von Foerster [1959], i quali giunsero a formulare una equazione che esprime la variabile N come funzione di due variabili indipendenti: il tempo t e l'**età cronologica** degli individui a (age) cioè $N=N(t,a)$. Per una popolazione strutturata in cui non ci siano né nuovi nati né morti si può scrivere l'equazione di McKendrick

$$\frac{\partial N(t,a)}{\partial t} + \frac{\partial N(t,a)}{\partial a} = 0 \quad (1)$$

Mentre tenendo conto della mortalità degli individui l'equazione precedente, secondo Von Foerster, diviene:

$$\frac{\partial N(t,a)}{\partial t} + \frac{\partial N(t,a)}{\partial a} = -D(a) \cdot N(t,a) \quad (2)$$

Attraverso le derivate parziali è possibile descrivere una popolazione che al trascorrere del tempo t , accresce la propria età a , ponendo che al tempo $t=0$ si abbia $a=0$. La soluzione del modello di Von Foerster ci dice che una generica popolazione al tempo t essa sarà costituita da individui di età a diverse, mentre se si considera gli individui appartenenti ad una coorte di quella popolazione, dopo un tempo t dalla nascita, se non muoiono, avranno tutti la stessa età $a = t$.

Questa conclusione è piuttosto “banale” e non aderente a ciò che si osserva nella realtà, infatti l'esperienza dimostra che individui nati contemporaneamente si sviluppano distribuiti nel tempo (processo stocastico) [Curry and Feldman, 1987]. Le ragioni di questa distribuzione si devono ricercare nella diversità genetica degli organismi, nella differente disponibilità di risorse ed infine nei possibili microclimi, che diversificano l'ambiente. Inoltre la variabile a , facilmente misurabile nelle popolazioni umane, è di scarsa utilità generalizzando i modelli alle popolazioni naturali di piante ed animali. Per questi motivi, per simulare il grado di sviluppo (l'invecchiamento) degli individui di una popolazione è preferibile riferirsi agli stadi fenologici del ciclo vitale direttamente osservabili in natura. Il

ciclo vitale (Fig.1) è, la successione ordinata di tutte le reazioni chimiche coerenti effettuate nel corso della vita del sistema vivente. Dato che una parte di queste reazioni serve per sostenere i processi fisiologici (metabolismo, riproduzione, ecc.) ed una parte per costruire strutture (membrane, tessuti, organi, ecc.) la forma esteriore (fenotipo) di un sistema vivente cambia nel corso del ciclo vitale. Tramite l'osservazione dei cambiamenti di tipo fisico è determinabili per ciascun individuo lo **stadio** (per gli animali o la **fenofase** per le piante) di sviluppo raggiunto, ad esempio la larva di un insetto o la fioritura di una pianta. Il ciclo vitale degli individui di una specie è, quindi, caratterizzato (a scala macroscopica) da una successione di stadi (o fenofasi) caratteristici per tutti gli individui facenti parte della stessa specie.

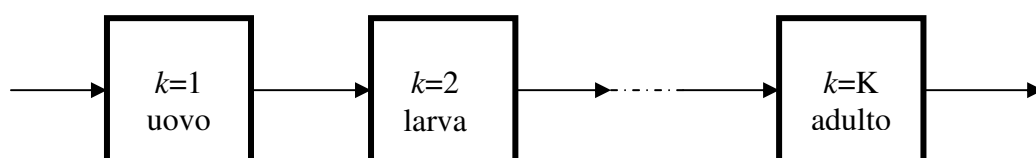


Fig.1. Rappresentazione schematica del ciclo vitale (modello compartimentale) di un individuo. L'indice $k=1,2,\dots,K$ definisce gli stadi (o fenofasi).

Il passaggio attraverso gli stadi fenologici del ciclo vitale (sviluppo) da parte degli individui dipende dalla temperatura perché essa controlla la velocità delle reazioni (bio)chimiche del vivente. In particolare, per gli individui appartenenti ad una specie *peciloterna*⁷ [Podolskj, 1984], si ha che il tasso di sviluppo degli individui dipende dalla temperatura dell'ambiente che li circonda. Si dimostra sperimentalmente che allevando una coorti di individui della stessa specie a temperature $T[^\circ\text{C}]$ costanti differenti tra loro, gli intervalli di tempo necessari per il loro sviluppo $\Delta t[\text{d}]$, si riducono all'aumentare di T con un andamento assimilabile ad un'iperbole equilatera (Figura 2a). Calcolando poi il **tasso di sviluppo** R , cioè l'inverso del tempo Δt , si ottiene il grafico di Figura 2b. Come si può vedere per ampio un intervallo di temperature (area in grigio) la frazione di sviluppo degli individui presenti in uno stadio $R(T)$, ha un andamento assimilabile ad una retta. Oltre il valore T_{max} la tendenza si inverte, la curva assume un andamento diverso e non prevedibile (come per il Δt in Figura 2a), il motivo è che le alte temperature possono denaturare gli enzimi, i quali non sono più in grado di catalizzare le reazioni che avvengono normalmente nelle cellule.

⁷ Sistemi viventi che non hanno un sistema metabolico per il controllo della propria temperatura corporea che è, quindi, determinata dall'ambiente esterno.

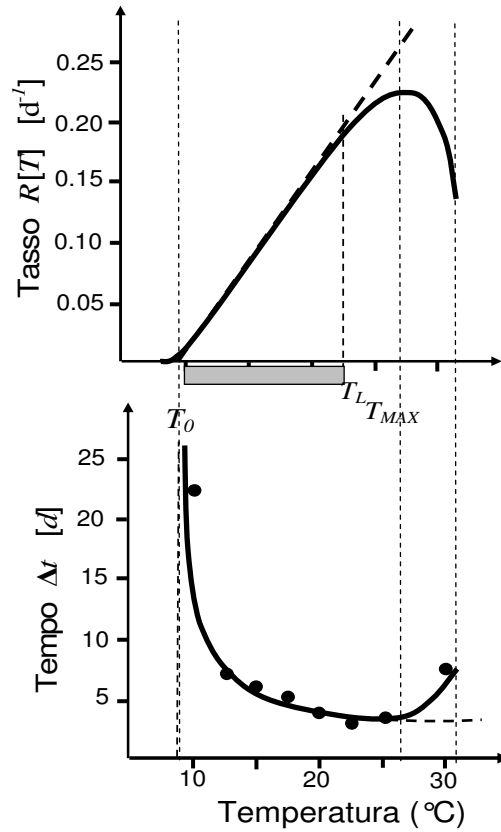


Figura 2. a) Andamento dei tempi di sviluppo Δt , in funzione della temperatura T . b) Andamento del tasso di sviluppo $R(T)$. T_0 è la soglia termica inferiore, T_L temperatura limite per l'andamento lineare, T_{MAX} soglia massima per la sopravvivenza degli individui.

Nel tratto lineare è possibile ricavare $R(T)$, come

$$R(T) = aT + b$$

dove a e b indicano rispettivamente il coefficiente angolare e l'intercetta della retta proposta. Definendo $T_0 = -\frac{b}{a}$ pari allo **zero di sviluppo**, che indica la temperatura

minima a cui la specie si sviluppa, determinabile attraverso esperimenti successivi su popolazioni della stessa specie, condotti a differenti temperature, si ottiene per $R(T)$ la seguente equazione:

$$R(T) = a[T + T_0]$$

E' intuitivo che gli individui che si trovano in uno stadio e procedono nello sviluppo con un tasso $R(T)$, ne escono quando è trascorso il tempo necessario perché lo sviluppo sia completo, ossia che valga l'equazione, nota come **somma dei tassi**:

$$\sum_{th-1}^{th} a [T_1 - T_0] = 1$$

La somma dei tassi, ricavata tramite il metodo della somma termica adottato da Reaumur (1735), risulta una legge generale dato che è possibile sostituire a T_1 , costante, una temperatura T variabile nel tempo, come avviene in natura.

Essa può essere modificata in questo modo

$$\sum_{th-1}^{th} T_1 - T_0 = \frac{1}{a} = U \quad [^{\circ}\text{Cd}]$$

in cui U rappresenta il **fabbisogno termico** degli individui di una popolazione necessario affinché raggiungano lo sviluppo e passino allo stadio (o fenofase) successivo. Esso viene misurato in $[^{\circ}\text{C}\cdot\text{d}$ (degree·day)] in quanto rappresenta la somma delle temperature, mantenute costanti, accumulate dagli individui all'interno dello stadio giorno dopo giorno, prima di fuoriuscirne maturi.

Tornando all'equazione di McKendrick e Von Foerster, per tenere conto di quanto detto riguardo lo sviluppo degli individui come attraversamento degli stadi del proprio ciclo vitale e risolvere l'equazione, Plant e Wilson [1986] proposero di sostituire l'**età fisiologica** a_k al posto dell'età cronologica a introducendo la discretizzazione arbitraria di a in k intervalli di ampiezza Δa (tutti uguali tra loro) si è posto (Metodo delle Linee):

$$a = a_k \text{ con } k = 1, 2, \dots, K \text{ e } \Delta a = a_k - a_{k-1}$$

L'equazione di Von Foerster (2), risolta mediante il Metodo delle Linee, nell'ipotesi che $D(a)$ sia nulla, dà luogo ad un sistema ricorsivo di k equazioni lineari:

$$\frac{dN_k(t)}{dt} = \frac{1}{\Delta a} [N_{k-1}(t) - N_k(t)] \quad (3)$$

in cui la variazione nel tempo della densità di popolazione è direttamente proporzionale alla differenza tra la densità di individui nello stadio k rispetto a quella nello stadio precedente ed inversamente proporzionale al tempo Δa , necessario per percorrere detto stadio.

In Figura 3 viene rappresentato graficamente il processo di sviluppo così come viene modellato dall'equazione di Von Foerster risolta col Metodo delle Linee: i rettangoli rappresentano gli stadi k e le frecce indicano i flussi di individui che entrano ed escono dai

ciascuno stadio; allora, in ogni stadio k , al tempo t , ci sarà un numero $N_k(t)$ di individui al suo interno che deriva dal flusso di individui $r_{k-1}(t)$ che entra e da quello $r_k(t)$ che esce.

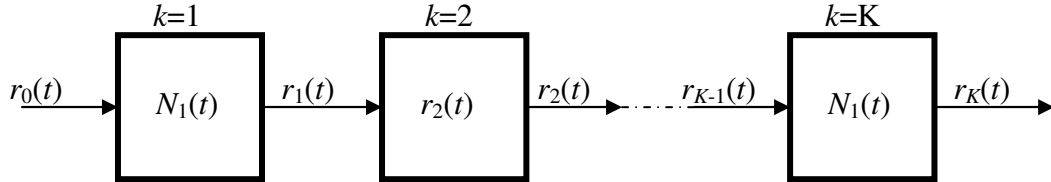


Figura 3. Rappresentazione schematica della dinamica di sviluppo degli individui di una coorte. I rettangoli rappresentano gli stadi k , le frecce i flussi di individui in ingresso ed in uscita dagli stadi.

Riscrivendo il sistema precedente in termini di flussi $r_k(t)$ d'individui (individui per giorno), anziché di densità di popolazione, si ottiene il 'Modello a Ritardo Distribuito Invariabile nel Tempo' ('Time Invariant Distributed Delay Model') proposto da Manetsch nel 1976:

$$\frac{dr_k(t)}{dt} = \frac{1}{\Delta a} [r_{k-1}(t) - r_k(t)] \quad (4)$$

La risoluzione del sistema di equazioni lineari del modello di Manetsch (4), nel caso che il flusso in ingresso nel primo stadio sia una coorte (matematicamente simulata da una funzione δ di Dirac), attraverso il sistema delle Trasformate di Laplace fornisce l'equazione:

$$r_k(t) = \frac{\left(\frac{K}{\Delta a}\right)^K}{(K-1)!} \cdot e^{-\frac{K}{\Delta a}t} \cdot t^{K-1} \quad (5)$$

La soluzione del modello di Manetsch ha la forma della nota famiglia di funzioni di Erlang, che si dimostra essere un caso particolare, a coefficiente discreto, della più generale funzione Gamma di Eulero. Da questa equazione si ricava un flusso in uscita dallo stadio K dipendente dal tempo, che indica un fenomeno stocastico, pur essendo deterministica la funzione d'ingresso (δ -Dirac o impulso di popolazione). In figura 4 è rappresentato come varia l'andamento della Funzione di Erlang al crescere del numero di stadi K attraversati dagli individui. Ciò che si riscontra è che per valori di $K > 1$ la curva è asimmetrica prima crescente e poi decrescente.

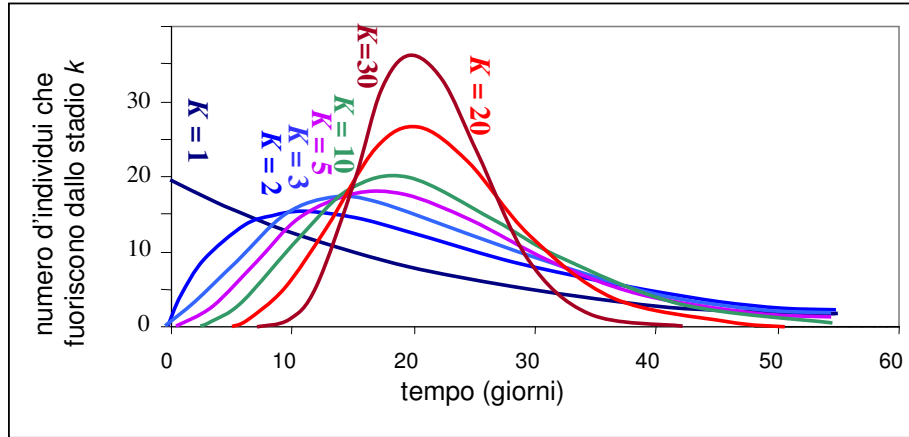


Figura 4. Famiglia di Funzioni di Erlang.

Il modello di Manetsch [1976] simula, un processo per cui individui che entrano nello stesso tempo in uno stadio fenologico ne escono in tempi diversi, cioè il processo stocastico più volte menzionato. Inoltre il modello a ritardo distribuito invariante nel tempo rispecchia la dipendenza del passaggio da uno stadio all'altro dalla temperatura.

Definendo, infatti, **DEL** (delay) l'età fisiologica necessaria ad una coorte per andare da $k = 1$ a $k = K$, per percorrere quindi l'intero ciclo vitale. **DEL** equivale il fabbisogno termico U , definito in precedenza, e si misura anch'esso in gradi giorno [$^{\circ}\text{Cd}$]. In questo modo l'intero intervallo DEL è stato suddiviso in K **sub-stadi equidistanti** Δa ; e quindi vale l'uguaglianza $\Delta a = \frac{DEL}{K}$.

Inserendo questa uguaglianza nella soluzione di Manetsch (5) si ottiene:

$$r_k(t) = \frac{\left(\frac{K}{DEL}\right)^K}{(K-1)!} \cdot e^{-\frac{K}{DEL}t} \cdot t^{K-1}$$

Inoltre, se la temperatura è costante è possibile riscrivere **DEL** come $DEL = U = (T_1 - T_0) \cdot \Delta t$, e quindi sostituire **DEL** all'interno della funzione di Erlang come segue:

$$r_k(t) = \frac{\left(\frac{K}{(T_1 - T_0) \cdot \Delta t} \right)^K}{(K-1)!} \cdot e^{-\frac{K}{(T_1 - T_0) \Delta t} t} \cdot t^{K-1}$$

Ai fini della presente Tesi di dottorato l'implicazione maggiore di quanto sin ora esposto è che una coorte che si sviluppa a temperatura costante avrà una distribuzione delle frequenze dei tempi di maturazione caratteristica e ripetibile asimmetrica prima crescente e poi decrescente. Tale distribuzione assume l'andamento della Funzione di Distribuzione di Erlang allorché il campione (coorte) è così cospicuo da rappresentare in maniera completa la variabilità genetica della specie. Spesso le coorti con cui si opera hanno un numero di individui 'piccolo' rispetto ai 'casi possibili' per i geni e, quindi, per aumentare la statistica e risalire alla distribuzione della specie bisogna ripetere parecchie volte gli esperimenti. Infine, è importante sottolineare che una coorte, che si sviluppa ad una data temperatura in condizioni di stress, dà luogo ad una distribuzione delle frequenze dell'età di maturazione "diversa" da quella di una coorte simile (geneticamente) che si sviluppa senza stress alla stessa temperatura.

3. IL MODELLO BIOLOGICO

3.1. Lo *Xenopus laevis*

Classe	Anfibia
Ordine	Anura
Famiglia	Pipidae
Genere	<i>Xenopus</i>
Specie	<i>X. laevis</i>



Fig.1 Immagine di *Xenopus laevis*.

Il genere di rane africane attualmente noto col nome di *Xenopus* fu scoperto nel 1802 da Daudin. Data la somiglianza con il genere di rospi *Bufo*, inizialmente egli suggerì la denominazione *Bufo laevis* a causa della sua pelle liscia (in latino, *laevis*). La prima descrizione dettagliata di *Xenopus* fu effettuata in seguito da Cuvier [1829], il quale propose il nome di *Dactylethra*, che venne mantenuto sino al 1890. Il nome generico *Xenopus* fu suggerito per la prima volta da Wagler [1827], ma non venne adottato fino a quando nel 1890 Leslie non descrisse la vita di *Xenopus* nel suo ambiente naturale.

Lo *Xenopus laevis* vive naturalmente nelle regioni dell'Africa meridionale, il suo areale occupa principalmente il Sud Africa e si estende verso nord-est fino allo Zimbabwe ed al Mozambico.

Lo *Xenopus* è un animale completamente acquatico, per cui trascorre l'intero ciclo vitale in acqua o pozze fangose e non è in grado di resistere a lungo in luoghi asciutti. Questo suo adattamento alla vita acquatica determina un'architettura del corpo particolare, rispetto alla maggior parte degli altri Anuri, infatti è strutturato per adattarsi al nuoto piuttosto che alla vita sulla terraferma (Fig. 1). Esso appare compresso dorsoventralmente, con gli arti posteriori molto lunghi e piegati esternamente anziché flessi sotto il corpo, quelli anteriori sono anch'essi orientati verso l'esterno ma molto corti. Il capo è minuto in confronto al corpo e gli occhi sono piuttosto piccoli e meno prominenti di quelli delle rane terrestri. Il colore dorsale appare grigio-verde, ma può assumere tonalità più chiare o più

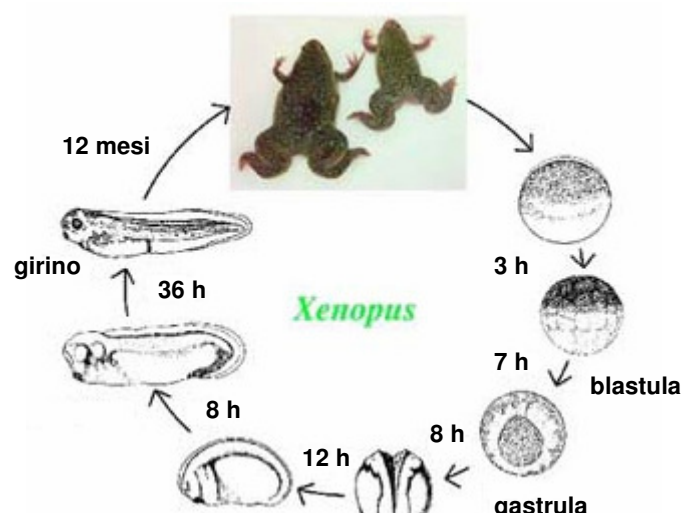
scure per confondersi con il fondale, il ventre risulta invece di un colore bianco-giallastro. In *Xenopus* è presente un pronunciato dimorfismo sessuale, per cui le femmine sono grandi circa due volte i maschi e possiedono la papilla cloacale. La pelle è liscia e ricoperta di un muco maleodorante che ha la funzione di allontanare i predatori, non essendo però tossico tranne forse per alcuni Anfibi [Deuchar, 1975].

Secondo Berk [1938] in Sud Africa la stagione dell'accoppiamento ha inizio alla fine dell'inverno e si estende fino alla primavera, durante questo periodo le femmine possono compiere due o tre ovideposizioni. A latitudini più settentrionali lo *Xenopus* si riproduce più tardi. Avendo necessità di riprodursi all'interno di invasi la stagione più favorevole risulta essere l'estate australe, che sebbene sia molto calda presenta un'elevata umidità, completamente assente invece negli aridi mesi invernali e primaverili. A questo proposito, Kalk [1960] ha osservato che nel nord del Sud Africa la stagione dell'accoppiamento si estende da settembre a gennaio [Deuchar, 1975]. Essendo una specie peciloterma per i processi fisiologici è legata alla temperatura dell'ambiente che la circonda, in particolare Nieuwkoop & Faber [1956] riportano che l'abbondanza delle ovideposizioni dipendono dalla temperatura del giorno precedente. Nel pieno della stagione dell'accoppiamento, infatti le deposizioni risultano abbondanti qualora il giorno prima la temperatura superficiale dell'acqua dello stagno abbia superato i 21°C; all'inizio della stagione, quando le temperature medie sono inferiori, il limite si riduce e con esso la quantità di uova deposte. Quando il maschio è pronto per l'accoppiamento mostra sulla superficie interna delle dita, dei palmi, e degli arti anteriori papille di colorazione nera. Esso inizia il corteggiamento emettendo un verso caratteristico ed afferrando la femmina nella regione pelvica, grazie alle secrezioni adesive presenti sui suoi arti si mantiene così attaccato alla femmina durante la copula. Il maschio fertilizza le uova nel mentre che la femmina le depone. L'accoppiamento può durare fino a 24 ore e le uova deposte sono dotate ciascuna di una capsula gelatinosa, come avviene negli Urodeli, al contrario di altre rane le cui uova sono racchiuse in un'unica massa gelatinosa. In condizioni di temperature comprese tra 20 e 25 °C, ritenute ottimali per lo sviluppo di *Xenopus* [Nieuwkoop & Faber, 1956], le larve si schiudono entro tre giorni dalla deposizione e raggiungono la metamorfosi in circa due mesi.

Durante il periodo invernale, per difendersi dal periodico prosciugamento degli stagni in cui vive, lo *Xenopus* si rifugia sotto uno strato di fango ed entra in una fase di latenza in cui le attività metaboliche e motorie sono molto ridotte; per poi ripristinare il normale comportamento allorché le condizioni ambientali tornano ad essere favorevoli.

Come tutti gli Anfibi, lo *Xenopus* attraversa una fase delicata dello sviluppo, la metamorfosi, durante la quale avviene il passaggio da larva (girino) a adulto (rana). In questa fase l'organismo subisce delle profonde trasformazioni fisiologiche e comportamentali. La respirazione da branchiale (che avviene tramite scambi gassosi controcorrente, tra l'acqua e i capillari sanguigni) diviene polmonare (con scambi gassosi tra capillari ed aria all'interno dell'organismo). Anche la dieta muta durante la metamorfosi, così da animale erbivoro filtratore si trasforma in carnivoro. Da adulto, lo *Xenopus* si può nutrire di ogni tipo di materiale di origine animale, vivo o morto, presente nell'ambiente.

Negli anni immediatamente successivi alla sua scoperta, gli studi su *Xenopus* riguardarono principalmente la sistematica, la biogeografia e l'etologia dell'animale. Venne scoperto, ad esempio, che questi animali non tollerano acque contenenti ioni rame e cloro, mentre nello stadio larvale necessitano di calcio per la sintesi dell'apparato scheletrico. Dal 1930 in poi invece, le ricerche si rivolsero alla fisiologia della riproduzione, da quando in particolare si scoprì la sua pronta risposta fisiologica alla stimolazione ormonale delle gonadi. Infatti, la somministrazione di gonadotropine, fattori attivi della ghiandola pituitaria, causa nelle femmine di Anuri la deposizione delle uova e stimola contemporaneamente la maturazione degli spermatozoi nei maschi. Questa caratteristica venne utilizzata per usi clinici per verificare lo stato di gravidanza delle donne. Infatti, se incinte, le donne eliminano nell'urina alte concentrazioni di ormone luteinizzante (LH), che somministrato alle femmine di rana provoca la deposizione immediata delle uova. Mediante questo trattamento ormonale è possibile, quindi, indurre negli adulti di rana la riproduzione, ottenendo, in tal modo la deposizione delle uova ad un tempo predefinito. Il vantaggio di impiegare lo *Xenopus*, invece di altre specie, in esperimenti di laboratorio sta nel fatto che quest'animale risponde allo stimolo ormonale durante tutto l'anno e non solo nella stagione riproduttiva. Il ciclo vitale dello *Xenopus* è determinabile osservando i mutamenti morfologici, a cui va in contro l'individuo, dalla fase embrionale a quella di adulto (Fig. 2).



3.2 Il modello di sviluppo dello *Xenopus*

L'approccio adottato in questa Tesi per lo studio della dinamica di popolazione dello *Xenopus laevis* si basa sull'individuazione della successione di stadi che determinano lo sviluppo dell'animale, a cui applicare il modello matematico a ritardo distribuito, trattato nel (paragrafo 2.3.1).

Lo sviluppo di un Anfibio si può schematizzare dallo stadio di uovo fecondato a quello in cui sopraggiunge la morte come il passaggio attraverso una serie di stadi riconoscibili (embrione, larva, metamorfosi, adulto) (Fig. 3). Pertanto in un determinato tempo, una popolazione di Anfibi si troverà ad avere al suo interno individui che si trovano in stadi di maturazione diversi tra loro ma tutti riferibili ad una stessa sequenza ordinata, propria della specie.

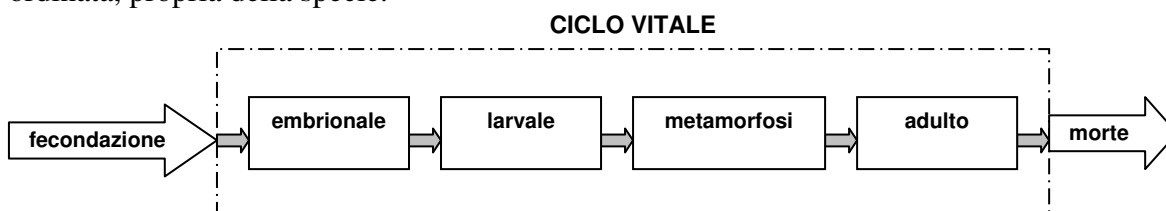


Fig. 3 Rappresentazione schematica del ciclo vitale di un Anfibio.

Il ciclo vitale dello *X. laevis* presenta una successione di sub-stadi⁸ embrionali, larvali (premetamorfici e prometamorfici) sino alla completa metamorfosi, ben distinguibili tra loro e riconoscibili con l'ausilio di tavole di riferimento. Nieuwkoop e Faber [1956] nel testo “*Normal table of Xenopus laevis (Daudin)*” (in seguito citato come NT) distinsero 66 diversi sub-stadi di sviluppo, rappresentabili schematicamente come in Fig. 4. L'identificazione degli stadi riportata nelle NT è stata adottata ai fini della determinazione del sub-stadio di sviluppo raggiunto giornalmente da ciascun individuo componente le coorti.

Come si osserva in Fig. 4 una volta avvenuta la fecondazione, l'uovo inizia il processo di segmentazione dando vita ad un embrione. D'Ancona [1965] spiega che non è sempre possibile delineare un limite netto tra sviluppo embrionale e larvale di un

⁸ Sub-stadio= stadio di sviluppo intermedio identificabile attraverso una variazione strutturale dell'individuo pur rimanendo nell'ambito di uno stadio (embrionale o larvale ecc.) del proprio ciclo vitale.

organismo, e che è opportuno fissarlo in corrispondenza di qualche momento caratteristico dell'ontogenesi⁹. Per gli Anfibi, il limite è rappresentato dal momento in cui si completa il riassorbimento del tuorlo e l'individuo comincia ad assumere il proprio nutrimento dall'esterno [Cotronei, 1945].

Nel caso specifico dello *X. laevis*, l'embrione si sviluppa come tale fino al sub-stadio 44 (in cui avviene il riassorbimento del tuorlo) (Fig. 4). Dal successivo stadio 45 fino alla completa metamorfosi (sub-stadio 66) l'individuo attraversa lo stadio larvale e si nutre filtrando il fitoplancton e lo zooplancton presente in sospensione nell'acqua. In particolare nel lavoro di tesi vengono identificati i sub-stadi dal 48 al 58 analizzando la distribuzione dei cromatoforesi, lo sviluppo dell'intestino e soprattutto l'evoluzione degli arti posteriori ed anteriori. Infatti al sub-stadio 48 è riconoscibile allo stereomicroscopio il primo abbozzo dell'arto posteriore che si evolve esternamente in parallelo a quello anteriore (interno al tessuto epiteliale) sino al 58, in cui ad occhio nudo è possibile rilevare la fuoriuscita di almeno uno dei due arti anteriori. Ai sub-stadi dal 59 al 66 corrispondono le profonde mutazioni morfologiche e fisiologiche del climax metamorfico che portano alla struttura definitiva dell'individuo adulto.

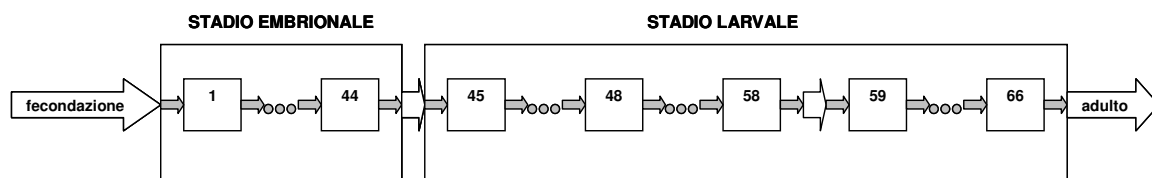


Fig. 4. Rappresentazione schematica degli stadi (e sub-stadi) di sviluppo dello *X. laevis* dall'ovideposizione all'adulto.

La sequenza di stadi larvali compresi nell'intervallo (48-58), dei quali di seguito si riporta una descrizione dettagliata con particolare riferimento allo sviluppo dei caratteri morfologici esterni, è rappresentata in figura (5). Nella descrizione qui riportata, come detto si fa riferimento al testo NT. Dato però che per la costruzione di dette tavole lo *Xenopus* è stato fatto sviluppare a temperature tra 22 e 24 °C, mentre negli esperimenti di questa tesi lo sviluppo è avvenuto a 24.0±0.2 °C, le età dei girini a cui si identificano i differenti sub-stadi risultano leggermente inferiori.

Sub-stadio Caratteri morfologici esterni

⁹ Insieme dei processi di sviluppo embrionali e postembrionali di un organismo.

- 48 Età 7 giorni e ½. Lunghezza 14-17 mm. Abbozzo dell'arto anteriore visibile per la prima volta; l'abbozzo dell'arto posteriore è semicircolare in aspetto laterale. Inizio della pigmentazione attorno al nervo acustico. Addome di colore dorato splendente.
- 49 Età circa 12 giorni. Lunghezza 17-23 mm. Abbozzo dell'arto anteriore visibile; abbozzo dell'arto posteriore poco più lungolinea distale ancora circolare, nessuna costrizione alla base. Melanofori appaiono sulle pinne ventrali e dorsali.
- 50 Età circa 15 giorni. Lunghezza 20-27 mm. Abbozzo dell'arto anteriore di forma quasi ovale nell'aspetto dorsale; abbozzo dell'arto posteriore più lungo che largo, costretto alla base con linea distale leggermente conica.
- 51 Età circa 17 giorni. Lunghezza 28-36 mm. Abbozzo dell'arto anteriore di forma ovale in aspetto laterale; abbozzo dell'arto posteriore di forma conica, la sua lunghezza è circa 1 volta e ½ la sua larghezza; melanofori appaiono su di esso.
- 52 Età circa 21 giorni. Lunghezza 42-56 mm. Abbozzo dell'arto anteriore irregolarmente conico; abbozzo dell'arto posteriore mostra la prima indicazione della costrizione della caviglia ed il primo segno di appiattimento del piede.
- 53 Età circa 24 giorni. Lunghezza 50-60 mm. Arto anteriore e posteriore nello stadio di zampa palmata. Arto posteriore senza piede; quarto e quinto dito indicati.
- 54 Età circa 26 giorni. Lunghezza 58-65 mm. Nell'arto anteriore tutte e quattro le dita sono indicate, bordo della mano leggermente a conchiglia; melanofori appaiono sull'arto anteriore. La lunghezza dell'arto posteriore senza il piede è circa 2 volte la sua larghezza; tutte e cinque le dita sono presenti, la seconda solo leggermente evidente.
- 55 Età circa 32 giorni. Lunghezza 70-80 mm. La mano è girata di circa 90°, le parti libere delle dita hanno lunghezza e larghezza simili. La lunghezza dell'arto posteriore senza il piede è circa 3 volte la sua larghezza
- 56 Età circa 38 giorni. Lunghezza 70-100 mm. Gomito e polso chiaramente presenti; la lunghezza delle parti libere delle dita va da 3 a 4 volte la loro larghezza.

- 57 Età circa 41 giorni. Lunghezza 75-105 mm. Angolo del gomito maggiore di 90°; le dita sono stese fuori dall'atrio dell'arto anteriore, la loro lunghezza è circa 7 volte la larghezza.
- 58 Età circa 44 giorni. Lunghezza 80-110 mm. Gli arti anteriori fuoriescono; tutte e tre le unghie sono presenti nell'arto posteriore.

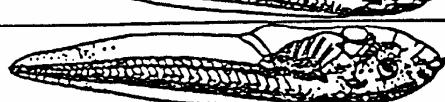
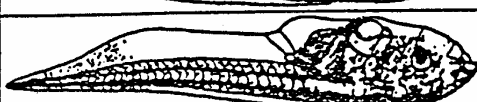
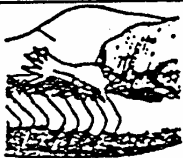
ARTO ANTERIORE	ARTO POSTERIORE	LARVA	STADIO
			48
			49
			50
			51
			52
			53
			54
			55
			56
			57
			58

Fig.4 Rappresentazione grafica dei 10 stadi larvali secondo [Nieuwkoop & Faber, 1956] osservati nel corso degli esperimenti

4 PARTE I: ESPERIMENTI CAMPI A BASSA FREQUENZA E DINAMICA DI POPOLAZIONE

L'obiettivo delle due serie di esperimenti svolti è di verificare come particolari combinazioni frequenza-ampiezza di un campo ELF influenzino lo sviluppo di una popolazione di *Xenopus laevis*. Per poter evidenziare gli eventuali effetti, per ognuna delle due serie sono state eseguite tre prove sperimentali in ciascuna delle quali si è fatto ricorso a quattro campioni (due esposti e due di controllo) di individui provenienti dagli stessi genitori e nati contemporaneamente (coorti). In questo modo si è voluto limitare il più possibile, nel singolo test, le diversità di velocità di sviluppo attribuibili alla variabilità genetica.

4.1 Protocollo sperimentale

In ciascuna prova sperimentale è stata indotta la riproduzione di una coppia di adulti di *X. laevis* secondo la seguente procedura (riportata nell'articolo Severini et al. in appendice, sottoposto per l'accettazione alla rivista International Journal of Radiation Biology).

Ciascun esperimento ha avuto inizio con la formazione delle coorti da embrioni appartenenti alla stessa deposizione, inducendo la maturazione dei gameti in una coppia di adulti di *X. laevis*, mediante iniezioni di gonadotropina corionica umana (HCG 5.000 U.I.). La somministrazione di HCG è stata effettuata tramite iniezione nel sacco linfatico dorsale: per il maschio, la dose è 400 U.I. in 0,5 ml di soluzione di Holtfreter (soluzione fisiologica per Anfibi) una volta ogni 24 ore per tre giorni; per la femmina, 800 U.I. in 1,0 ml di soluzione di Holtfreter una sola volta, in concomitanza della terza somministrazione al maschio. La coppia è stata quindi posta in un ambiente debolmente illuminato all'interno di un acquario riempito con acqua alla temperatura di 21.0 ± 0.2 °C (in accordo con NT) perché durante la notte potessero accoppiarsi e deporre. L'acquario predisposto per la riproduzione ha una rete disposta orizzontalmente ed immersa nell'acqua (Fig. 1) che mantiene la coppia sospesa sopra il fondo dell'acquario dove si posizionavano due vassoi

per raccogliere le uova deposte. Gli animali sono stati osservati durante la notte ad intervalli regolari di un ora per stimare il momento della deposizione. La maggior parte delle uova sono state deposte durante un intervallo di circa due ore nel primo mattino.

Al termine della deposizione gli adulti sono stati delicatamente rimossi dall'acquario di riproduzione. Un vassoio (contenete le uova in sviluppo) è stato posizionato all'interno del solenoide per iniziare l'esposizione al campo magnetico, mentre l'altro vassoio è stato messo lontano per divenire il campione di controllo. La temperatura dell'acqua nei due vassoi veniva innalzata fino a 24.0 ± 0.2 °C (temperatura ottimale per lo sviluppo di questo animale secondo le NT). Questa data è stata considerata il giorno di sviluppo ($j=1$).

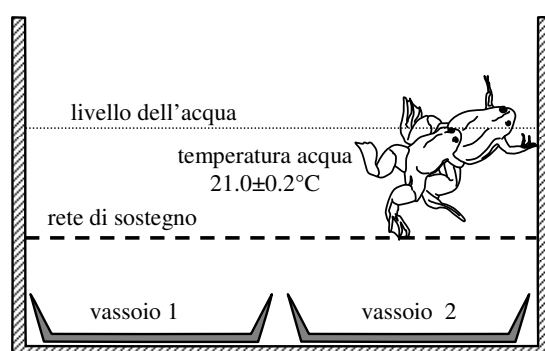


Figure 1. Acquario predisposto per la riproduzione con rete di sostegno per gli adulti e vassoi per raccogliere le uova fertilizzate [Severini et al., in review].

Al giorno $j=3$, le larve (in gran parte al sub-stadio 39 della classificazione contenuta nelle NT), erano abbastanza robuste per essere osservate allo stereomicroscopio, e sono state trasferite in quattro acquari identici costruiti appositamente per lo sviluppo degli animali e coerenti con l'introduzione nel solenoide. Due campioni (coorti) di 35 girini nel sub-stadio 39 sono stati pescati dal vassoio esposto e trasferiti in due nuovi acquari (E1 e E2), nuovamente posizionati all'interno del solenoide. Nel medesimo modo sono stati selezionati due campioni di 35 girini dal vassoio di controllo e posti in due acquari C1 e C2 sempre distanti dal solenoide, in qualità di controlli. Gli acquari sono stati celati dalla luce affinché i girini potessero svilupparsi al buio, eccetto nel breve periodo (circa 1 ora) necessario per l'osservazione giornaliera. Il quinto giorno è iniziata la somministrazione della dieta giornaliera costituita, come suggerito nelle NT, da 35 gl^{-1} di infuso di ortica essiccata, il quantitativo di 40 ml per acquario il giorno $j=5$, è stato innalzato a 70 ml il giorno successivo, ed aumentato ulteriormente di 10 ml nei giorni $j=8$, $j=9$, $j=15$, $j=25$. Con questa procedura il cibo non è mai divenuto un fattore limitante e la disponibilità nell'acquario aumentava nel tempo in funzione dello sviluppo e della crescita

in biomassa degli individui. Dal giorno $j=7$, la somministrazione dell'alimento è stata preceduta dal cambio completo dell'acqua e dalla pulizia delle vasche (che da quel momento è stata eseguita ogni giorno). Dal giorno $j=11$ in poi, gli animali sono stati presi dai quattro acquari ogni giorno, posti in una capsula Petri per l'identificazione allo stereomicroscopio del sub-stadio prometamorfico (48-58) raggiunto da ciascun individuo. Questa operazione si fonda sul riconoscimento di alcuni caratteri morfologici, diversi a seconda dello stadio e messi in evidenza nelle NT [Nieuwkoop & Faber, 1956]. In particolare si osserva la distribuzione dei cromatofori, lo sviluppo dell'intestino e soprattutto l'evoluzione degli arti posteriori ed anteriori. I girini dei due acquari E1 ed E2, terminata l'osservazione sono stati nuovamente posizionati all'interno del solenoide, così come quelli degli acquari C1 e C2 collocati, al contrario, lontani da esso. L'esposizione degli animali è continuata senza interruzioni durante l'intero stadio larvale, ed è terminata solamente quando tutti i girini della prova avevano raggiunto il sub-stadio 58 (che dà inizio della metamorfosi).

4.2 Apparato sperimentale

Acquari

Le coorti di girini sono state allevate in acquari di vetro [Severini et al., 2003], come descritto nel paragrafo precedente. sono stati realizzati quattro acquari identici dove far sviluppare le coorti di *X. laevis* nella loro fase larvale ed è stato utilizzato un quinto acquario in cui la coppia di adulti ha potuto fecondare e deporre le uova.

Gli acquari in cui si è svolto lo sviluppo larvale degli *Xenopus* sono stati dimensionati in modo da:

- essere sufficientemente capienti per permettere la vita dei girini: ogni individuo nello stadio larvale necessita di almeno mezzo litro d'acqua affinché possa svilupparsi indipendentemente dagli altri e non debba esserci competizione per le risorse.
- poter entrare completamente all'interno del solenoide.

Gli acquari sono stati così realizzati in vetro, spesso 5mm, con dimensioni 40x26x26 cm.

Gli acquari E1, E2, C1, e C2 (0.26 m altezza, 0.40 m profondità, and 0.26 m lunghezza) sono stati riempiti con 17.5 litri (0.5 litri per girino) acqua di rubinetto precedentemente decantata a temperatura di ambiente. Infatti per evitare l'uso di riscaldatori elettrici all'interno degli acquari è stata controllata e mantenuta costante la temperatura dell'aria del laboratorio. La temperatura dell'acqua negli acquari è stata misurata in maniera continua 4

volte al giorno, le misure così ottenute indicano che i girini si sono sviluppati alla temperatura costante di $24.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$.

Solenoid

Per generare il campo magnetico sinusoidale al quale esporre i girini, è stato appositamente costruito un solenoide grande abbastanza da collocarne all'interno gli acquari. Il solenoide era un cilindro il cui diametro interno misura 0.40 m ed è lungo 1.60 m. All'interno del solenoide è stata posizionata una tavola di legno parallela al suo asse per sostenere i due acquari E1 ed E2 (Fig. 2a); questi ultimi venivano collocati il più vicino possibile alla sezione centrale del solenoide (Fig. 2b). Il solenoide era costituito da 1600 spire di rame ($\varnothing = 1\text{ mm}$), con una resistenza di $43\ \Omega$ ed una induttanza di 400 mH. Un generatore collegato al solenoide creava al suo interno un campo magnetico di frequenza $50.0 \pm 0.5\text{ Hz}$. Sfruttando le differenze significative nelle ampiezze del campo magnetico generate lungo l'asse a causa delle caratteristiche costruttive del solenoide, ho esposto le coorti di girini ad un campo magnetico di stessa frequenza e due valori efficaci di induzione magnetica leggermente differenti tra loro comprese negli intervalli ($64.9 \leq B \leq 77.3\ \mu\text{T rms}$ and $70.1 \leq B \leq 77.4\ \mu\text{T rms}$). Considerando che i girini delle coorti erano in continuo movimento negli acquari esposti, ho calcolato che i girini erano esposti negli acquari a due campi magnetici di stessa frequenza (50 Hz) e differenti intensità ($71.1 \pm 6.2\ \mu\text{T rms}$, $73.7 \pm 3.6\ \mu\text{T rms}$). La frequenza e l'ampiezza del campo veniva misurata settimanalmente mediante un EFA-3 (Wandel & Goltermann). Le misure mostravano differenze significative del campo lungo l'asse del solenoide a causa degli effetti di bordo con un valore massimo in prossimità del centro. La Figura 3a rappresenta le misure settimanali di induzione magnetica fatte alla distanza di 40 cm prima (A1) e dopo (A2) il centro (A). Si può notare come i due acquari siano esposti a due campi di differente intensità. La Figura 3b presenta il valor medio (e la deviazione standard) di 26 misure settimanali a 40 cm, 80 cm (centro del solenoide), e 120 cm dall'estremo del solenoide. Nei due acquari di controllo C1 e C2, le misure effettuate sono sempre state inferiori a $0.6\ \mu\text{T}$, pari al campo magnetico di fondo del laboratorio. La componente geomagnetica (statica) del campo lungo l'asse del solenoide era $B_0 = 20.6\ \mu\text{T}$. All'interno del solenoide non è stato rilevato riscaldamento quando l'apparato era acceso.

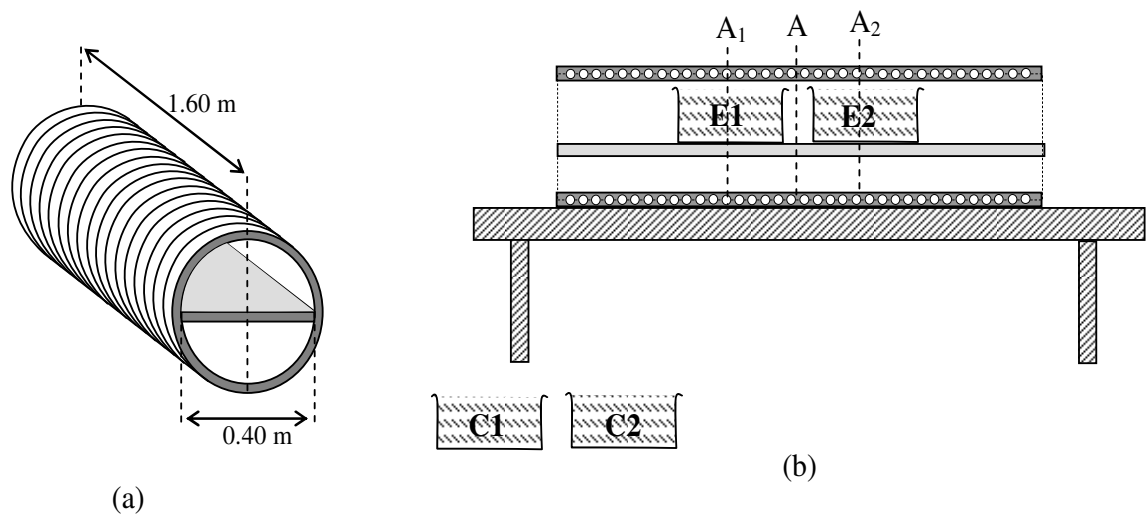


Figure 2. (a) Il solenoide con le sue caratteristiche spaziali e la tavola in legno per sostenere i due acquari E1 ed E2 (35 Kg). (b) Posizione dei due acquari E1 e E2 sulla tavola. A, centro del solenoide; A1, A2, centro degli acquari E1 e E2 e distanza da A. C1, C2 acquari di controllo [Severini et al., in review].

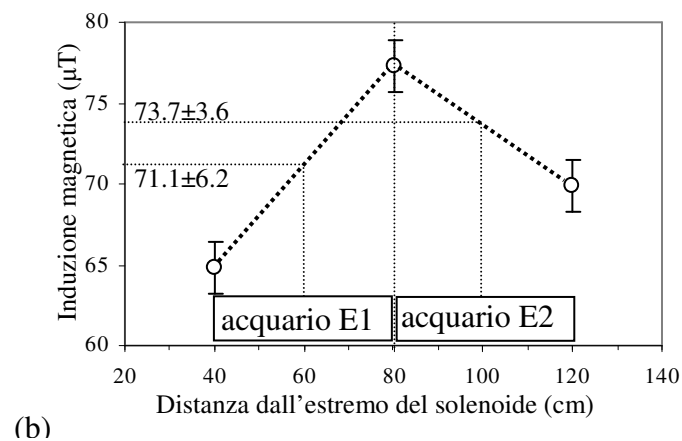
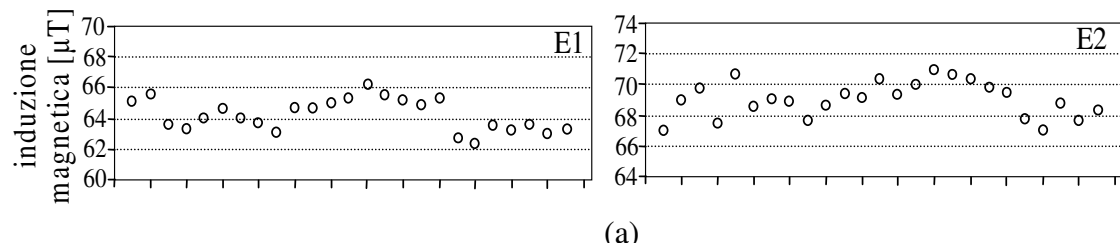


Figure 3. Induzione magnetica lungo l'asse del solenoide. (a) Misure settimanali di induzione magnetica nei punti A1 and A2 40 cm prima e dopo il centro del solenoide (figure 2) eseguite con un sistema di misura EFA-3 (Wandel & Goltermann) (b) Valor medio e deviazione standard dell'induzione magnetica misurata lungo l'asse del solenoide al centro di esso e a 40 cm prima e dopo il centro [Severini et al., in review].

4.3 Gestione dei dati sperimentali

Per ciascuna delle due serie (I,II) di esperimenti atti a rilevare l'effetto dell'esposizione al campo magnetico ELF sulla dinamica di sviluppo dello *Xenopus laevis* negli stadi prometamorfici sono state condotte tre ripetizioni (o deposizioni) che saranno indicate con la lettera i

$$i = 1, 2, 3$$

gli stadi di sviluppo prometamorfici dei girini di *X. laevis* (in accordo con le NT) con k

$$k = 48, 49, \dots, 58$$

le coorti di girini di ciascun esperimento h

$$h = 1, 2, 3, 4$$

corti rispettivamente (in) E1, E2, C1, C2,

e il tempo (in giorni) dell'esperimento, così come so l'età dei girini con l'indice j

$$j = 1, 2, 3, \dots, J_i$$

dove J_i è l'ultimo giorno dell' i -esimo esperimento.

La variabile

$$N(i,j,h,k)$$

rappresenta il numero (o la frequenza) dei girini che, nel j -esimo giorno del i -esimo esperimento, sono stati estratti dall' h -esimo acquario, e assegnati al k -esimo stadio. Per esempio, $N(1,5,1,50)$ dà il numero di individui che il quinto giorno del primo esperimento nell'acquario E1 erano nello stadio 50.

Il vettore di 11 componenti

$$V(k) \equiv N_{i,j,h}(k)$$

fornisce il risultato dell'osservazione dei girini estratti dall'acquario h nel giorno j -esimo dell' i -esimo esperimento, e il vettore di J_i componenti

$$U(j) \equiv N_{i,h,k}(j)$$

dà il numero giornaliero di individui nello stadio k nell'acquario h durante il corso dell'intero esperimento i .

Ponendo i vettori $V(k)$ l'uno dopo l'altro, si ottengono le matrici note come matrici stadio-frequenza (MSF) [Manly, 1989]

$$M(j,k) \equiv N_{i,h}(j,k)$$

In esse si collezionano tutte le frequenze dei girini dell'*h-esimo* acquario nell'*i-esimo* esperimento.

Il vettore

$$F_{i,h,k}(j) \equiv F(j) = U(j) - U(j-1) - D(j) \quad (1)$$

specifica il numero di individui entrati (o 'maturati') nello stadio k nel giorno j (flusso di girini maturi), a condizione che $D(j)$ è il numero di girini trovati morti nell'osservazione del giorno j , e che nessun girino attraversi più di uno stadio in un giorno; il vettore

$$W_{i,h,k}(j) \equiv W(j) = \sum_j F(j) \quad (2)$$

dà il flusso cumulate di girini maturati, cioè il numero totale di individui sino al giorno j nello stadio k ; ed il vettore

$$S_{i,h}(j) \equiv S(j) = \frac{\sum_{k=48}^{58} k \cdot N_{i,h}(j,k)}{\sum_{k=48}^{58} N_{i,h}(j,k)} \quad (3)$$

fornisce lo stadio di sviluppo medio dei girini nell'acquario h dell'*i-esimo* esperimento in funzione del tempo.

Gli esperimenti della serie I e II (eseguiti durante il primo e secondo anno del Dottorato di Ricerca) le frequenze ottenute a partire dalle osservazioni degli stadi di sviluppo raggiunti dai girini hanno fornito in totale 24 matrici stadio-frequenza (MSF) (2 serie di esperimenti per 3 ripetizioni ciascuna moltiplicate per le 4 coorti) di 11 colonne $M(j,k)$ (Appendice C tabelle da 1 a 24).

4.5 Analisi della varianza (ANOVA) e F-test

L'analisi della varianza (ANOVA) è un test statistico che verifica l'ipotesi di uguaglianza tra le medie di un fenomeno osservato in popolazioni distinte, determinate da livelli diversi di una o più variabili dette fattori. Stabilire se tale uguaglianza è supportata o meno dai dati sperimentali significa stabilire una relazione causale tra il fenomeno osservato e il/i fattore/i considerati.

Nel caso particolare degli esperimenti esposti in questa Tesi l'analisi è stata eseguita per verificare se, nel caso di campioni (coorti) trattati secondo diverse condizioni (esposte e non), i tempi medi di maturazione dei campioni siano differenti gli uni dagli altri a seguito del trattamento effettuato (campo magnetico), oppure se le differenze siano statisticamente non significative e quindi tutti i campioni derivino da una stessa popolazione di media μ e varianza σ^2 . In entrambe le serie di tre esperimenti sono stati testati quattro campioni (quattro coorti), di circa 70 individui ciascuno (girini di *Xenopus laevis*). Dato che i campioni erano influenzati contemporaneamente dalla presenza o meno dell'esposizione al campo magnetico (trattamento o fattore di variabilità I) e dalla provenienza da differenti covate (deposizioni o fattore di variabilità II) è stata impiegata l'analisi della varianza "a due vie".

Analizzando in maniera indipendente ciascuna coorte (esposta e non) si può costruire per ciascuna serie di esperimenti una tabella come la seguente:

		deposizioni i		
		1	2	3
trattamenti h	1	$n_{1,1}=35$	$n_{1,2}=35$	$n_{1,3}=35$
	2	$n_{2,1}=35$	$n_{2,2}=35$	$n_{2,3}=32$
	3	$n_{3,1}=34$	$n_{3,2}=35$	$n_{3,3}=35$
	4	$n_{4,1}=35$	$n_{4,2}=35$	$n_{4,3}=35$

Tab. 1. Tabella esplicativa in cui sono evidenziati i fattori di variabilità che influenzano lo sviluppo dei girini (trattamenti e deposizioni).

in cui sono presenti 4 trattamenti h e 3 deposizioni i . L'indice n identifica il numero di dati considerati o numero di replicazioni per ciascuna coorte (nell'esempio sono riportati i valori di n relativi alla prima serie di esperimenti). Come si riporta in Spiegel [1994], ai casi esposti in questo lavoro si applica l'analisi della varianza a due vie con replicazione. Supponendo che $X_{h,i,l}$ denoti una variabile corrispondente all' h -esimo trattamento, i -esima deposizione e alla l -esima replicazione. Il modello statistico che ne deriva è

$$X_{h,i,l} = \mu + \alpha_h + \beta_i + \gamma_{h,i} + \Delta_{h,i,l}$$

in cui μ è la media del campione, α_h rappresenta l'effetto del trattamento, β_i identifica l'effetto della deposizione, $\Delta_{h,i,l}$ sono variabili casuali indipendenti con distribuzione normale, media zero e varianza σ^2 , mentre $\gamma_{h,i}$ denota l'effetto di interazione tra i due fattori.

La variazione totale v di tutti i dati può essere suddivisa in variazioni dovute al trattamento v_t , in variazioni dovute alla deposizione v_d , all'interazione v_e ed al caso v_c :

$$v = v_t + v_d + v_e + v_c$$

che valgono:

$$v = \sum_{h,i,l} (x_{h,i,l} - \bar{x})^2$$

$$v_t = 4n \sum_{i=1}^3 (\bar{x}_{.j.} - \bar{x})^2$$

$$v_d = 3n \sum_{h=1}^4 (\bar{x}_{h..} - \bar{x})^2$$

$$v_e = n \sum_{h,i} (\bar{x}_{h,i.} - \bar{x}_{h..} - \bar{x}_{.i.} + \bar{x})^2$$

$$v_c = \sum_{h,i,l} (x_{h,i,l} - \bar{x}_{h,i.})^2$$

I punti evidenziano gli indici sommati. Di seguito viene riportata la tabella finale dell'analisi:

Variazione	Gradi di Libertà	Media dei quadrati	F
Tra i trattamenti v_t	4-1	$\hat{S}_t^2 = \frac{v_t}{4-1}$	$\frac{\hat{S}_t^2}{\hat{S}_c^2}$
Tra le deposizioni v_d	3-1	$\hat{S}_d^2 = \frac{v_d}{3-1}$	$\frac{\hat{S}_d^2}{\hat{S}_c^2}$
Interazione v_e	(4-1)(3-1)	$\hat{S}_e^2 = \frac{v_e}{(4-1)(3-1)}$	$\frac{\hat{S}_e^2}{\hat{S}_c^2}$
Casuale v_c	4·3(n-1)	$\hat{S}_c^2 = \frac{v_c}{4 \cdot 3(n-1)}$	
Totale	(4·3·n)-1		

Tab. 2 Tabella finale dell'analisi in cui sono indicate le variazioni che determinano la varianza totale, i gradi di libertà associati a ciascun termine e il valore critico della variabile F calcolata come rapporto tra le medie dei quadrati.

I rapporti dell'ultima colonna che forniscono il valore della variabile F da confrontare con quelli tabulati della distribuzione di Fisher possono essere utilizzati per sottoporre a test le ipotesi nulle:

H_0^1 = Tutte le medie dei trattamenti sono uguali, cioè non esistono differenze imputabili all'effetto del trattamento (campo magnetico).

H_0^2 = Tutte le medie delle deposizioni sono uguali, cioè non esistono differenze imputabili

all'effetto delle deposizioni.

H_0^3 = Non c'è interazione tra i due fattori di variabilità (trattamento e deposizione).

Per procedere nell'analisi è necessario verificare se può essere rigettata oppure no l'ipotesi nulla H_0^3 ad un opportuno livello di significatività. Infatti solo nel caso non sia possibile rigettare l'ipotesi H_0^3 (cioè i due fattori risultano tra loro indipendenti), si può procedere e sottoporre a test le prime due ipotesi nulle. Il livello di significatività indica la probabilità massima con cui si accetta di rischiare un errore di tipo I, ossia di rifiutare l'ipotesi quando dovrebbe essere accettata. Ad esempio al livello di significatività $\alpha=0.05$ ci sono 5 probabilità su 100 di rigettare l'ipotesi quando dovrebbe essere accettata, in altre parole si ha il 95% di probabilità di aver preso la decisione giusta.

5 RISULTATI

5.1 Esperimenti della serie I

Di seguito sono riportati i risultati della prima serie di tre esperimenti nei quali le coorti $h=1,2$ sono state esposte a due combinazioni di campo magnetico variabile rispettivamente (50 Hz, $71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$ e 50Hz, $73.7 \pm 3.6 \mu\text{T rms}$) generato all'interno del solenoide; mentre le due coorti $h=3,4$ sono state impiegate come controlli. In tutte le ripetizioni le quattro coorti risultavano esposte al campo geomagnetico del laboratorio $20,6 \mu\text{T}$. I risultati presentati in questa sede sono proposti nel lavoro di Severini et al., [in review].

5.1.1 Andamento delle frequenze di maturazione delle coorti

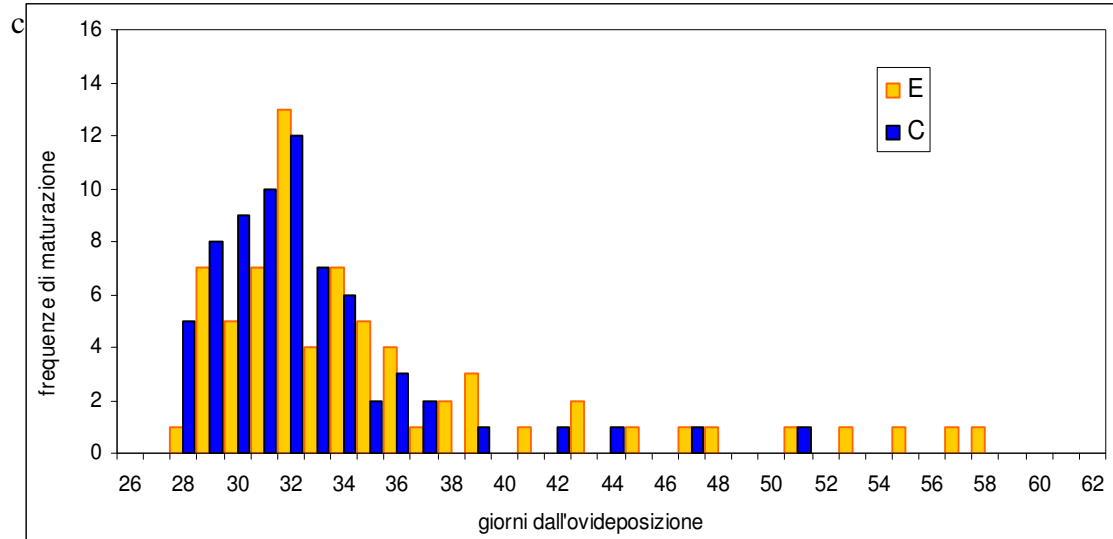
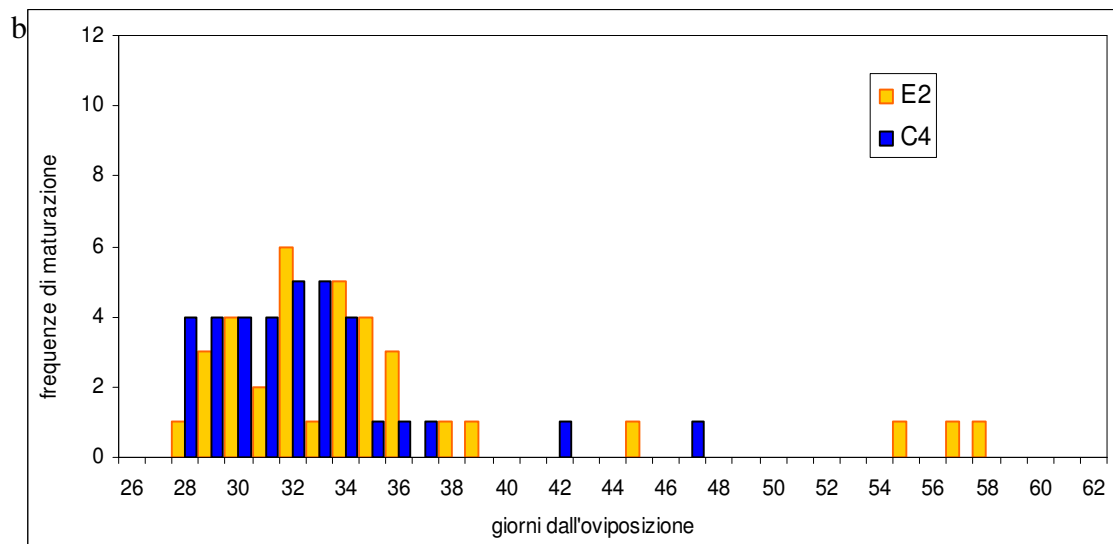
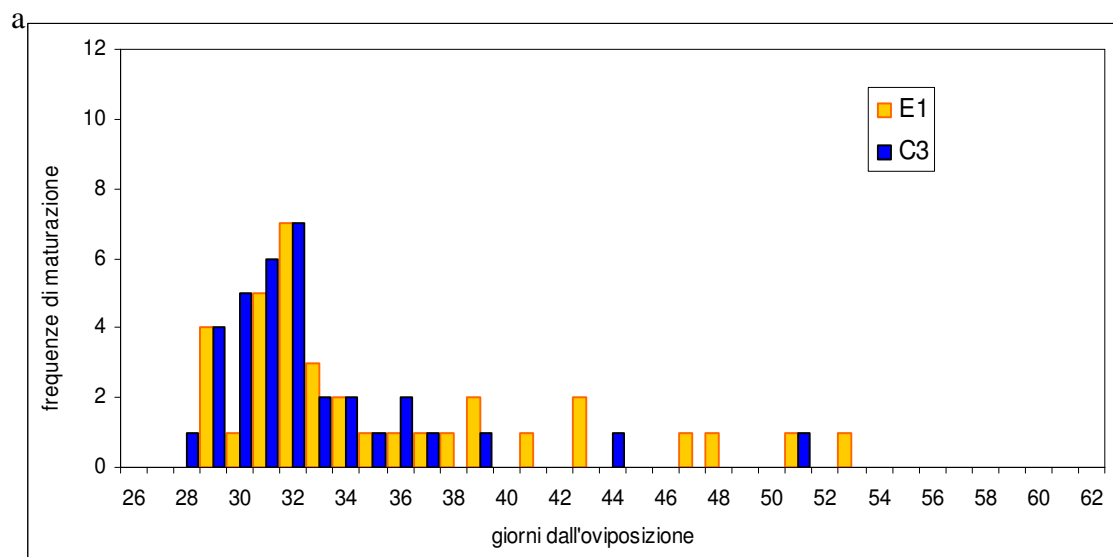
La tabella 1 fornisce un primo quadro dei risultati contenendo i flussi (frequenze) di maturazione dei girini, cioè il numero di girini che giornalmente raggiungono lo stadio 58 ($F_{i,h,58}(j)$ paragrafo 4.3) in funzione del tempo j della deposizione i e del trattamento h . Il primo e l'ultimo numero di ogni colonna indica rispettivamente il primo e l'ultimo girino maturo di ciascuna coorte e considerando il tempo j (prima colonna) si ha l'inizio ed il termine del periodo di maturazione di ciascuna coorte. La tabella dimostra che differenti deposizioni necessitano di tempi di sviluppo diversi, in particolare le coorti di controllo $h=3,4$ della seconda deposizioni hanno avuto lo sviluppo più rapido. La somma dei dati di ogni colonna (ultima riga) fornisce il numero totale di girini maturati. Dato che il numero iniziale di individui era 35 per ogni coorte, si può notare che i girini non hanno subito mortalità significativa, sia nelle coorti di controllo che in quelle esposte.

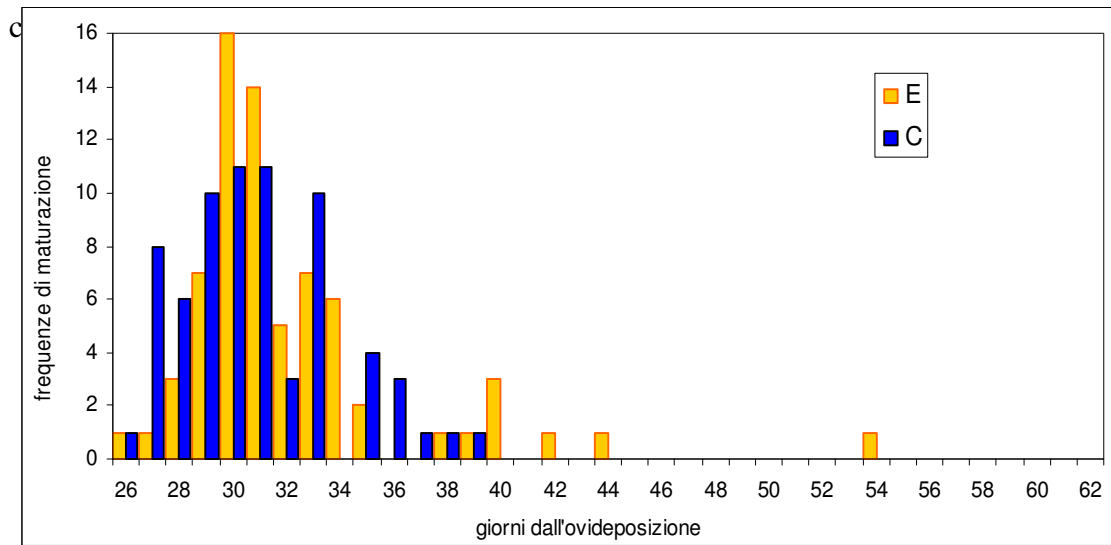
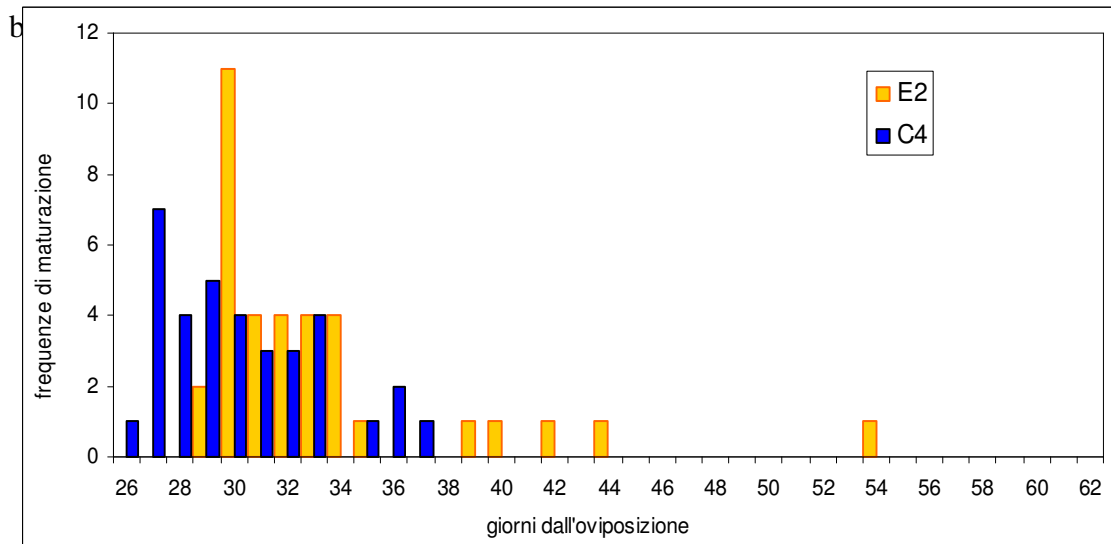
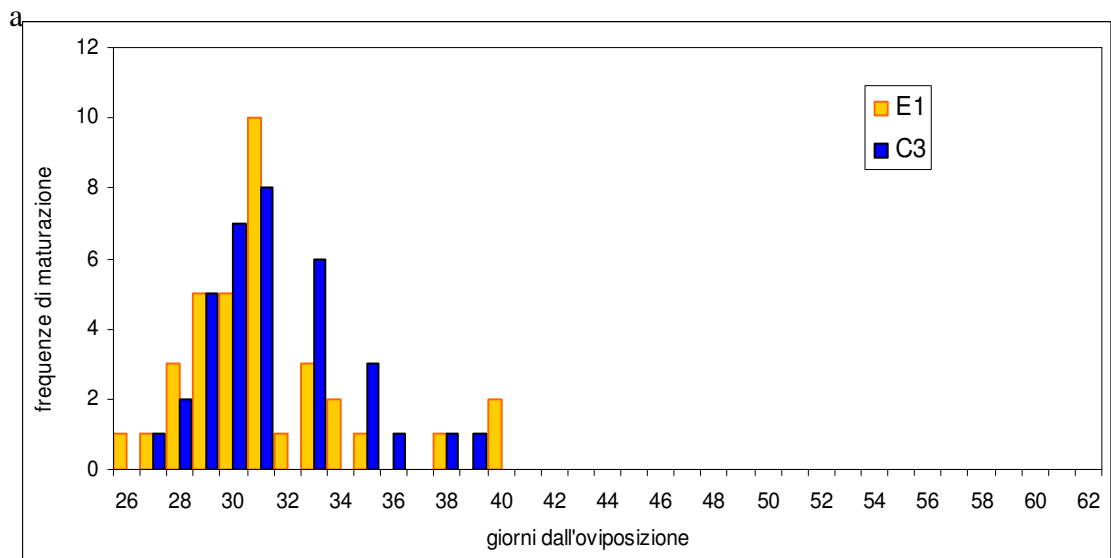
Nelle figure 1,2,3 vengono riportate le distribuzioni di frequenze di maturazione delle coorti della tabella 1. Ogni figura è costituita da tre grafici (a,b,c) che rappresentano rispettivamente l'andamento delle frequenze di maturazione della coorti $h=1,3$ (Esposta E1 e Controllo C3), delle coorti $h=2,4$ (Esposta E2 e Controllo C4) ed in ultimo quelle

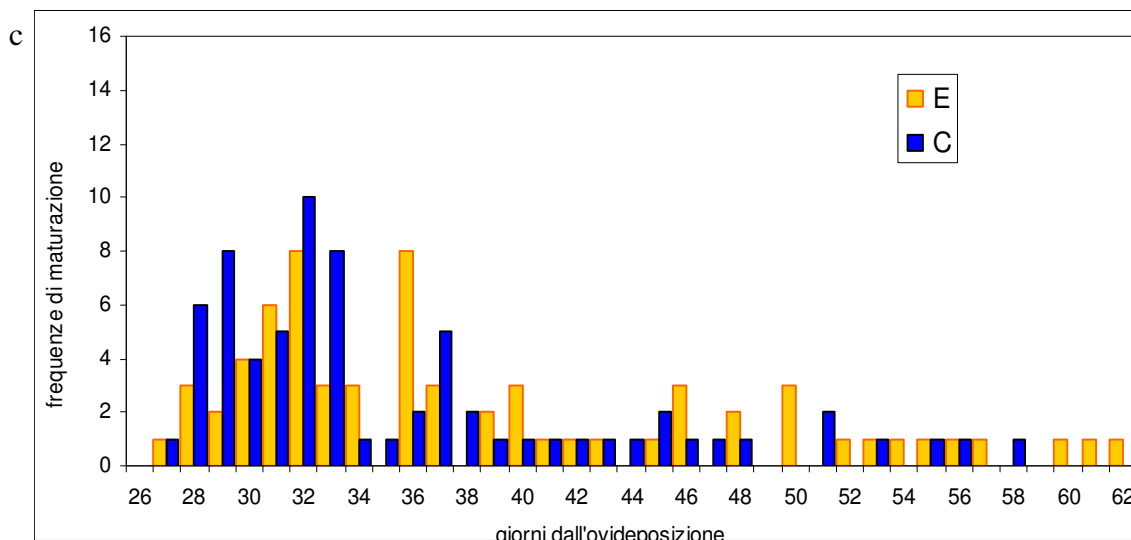
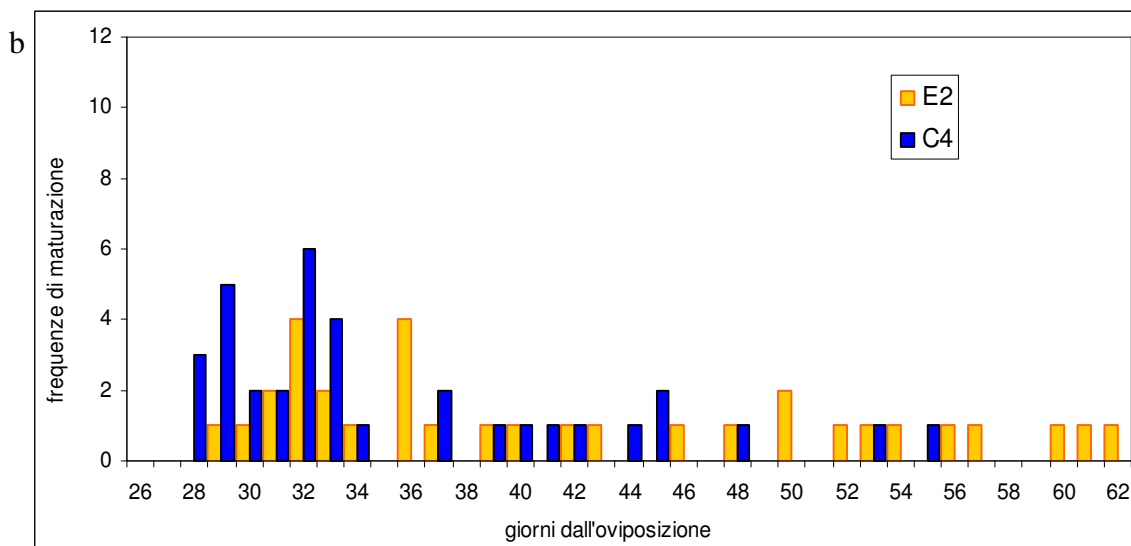
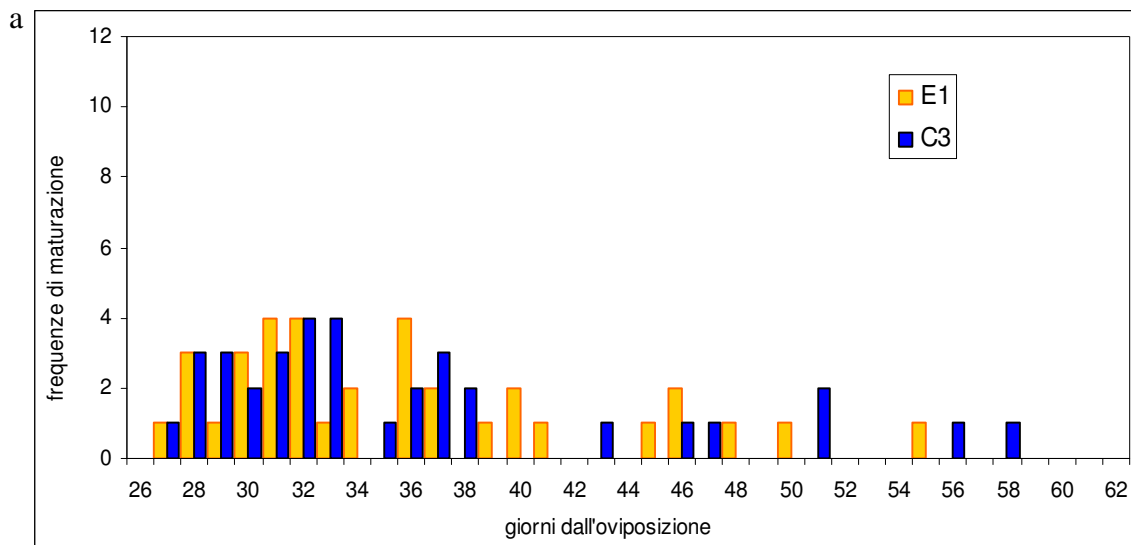
dell'insieme di coorti esposte E, e di controllo C. A conferma di quanto detto analizzando la tabella, dai grafici si osserva che lo sviluppo dei girini della seconda deposizione è stato il più rapido (ultimo girino maturo nel giorno 54), quello della terza complessivamente il più lento (ultimo girino maturo nel giorno 62). Nonostante le differenze imputabili all'appartenenza a differenti deposizioni, i dati suggeriscono un ritardo nel raggiungimento della metamorfosi delle coorti esposte rispetto a quelle di controllo, infatti sebbene tutte le distribuzioni presentino un andamento prima crescente e poi decrescente con un massimo evidente, quelle di controllo risultano nel complesso più coerenti di quelle degli esposti che hanno invece 'code' maggiormente prolungate nel tempo.

J	SERIE I											
	deposizione i=1				deposizione i=2				deposizione i=3			
	esposti h=1,2		controlli h=3,4		esposti h=1,2		controlli h=3,4		esposti h=1,2		controlli h=3,4	
	$F_{1,1,58}(j)$	$F_{1,2,58}(j)$	$F_{1,3,58}(j)$	$F_{1,4,58}(j)$	$F_{2,1,58}(j)$	$F_{2,2,58}(j)$	$F_{2,3,58}(j)$	$F_{2,4,58}(j)$	$F_{3,1,58}(j)$	$F_{3,2,58}(j)$	$F_{3,3,58}(j)$	$F_{3,4,58}(j)$
26					1			1				
27					1		1	7	1		1	
28		1	1	4	3		2	4	3		3	3
29	4	3	4	4	5	2	5	5	1	1	3	5
30	1	4	5	4	5	11	7	4	3	1	2	2
31	5	2	6	4	10	4	8	3	4	2	3	2
32	7	6	7	5	1	4	0	3	4	4	4	6
33	3	1	2	5	3	4	6	4	1	2	4	4
34	2	5	2	4	2	4	0	0	2	1	0	1
35	1	4	1	1	1	1	3	1	0	0	1	0
36	1	3	2	1	0	0	1	2	4	4	2	0
37	1	0	1	1	0	0	0	1	2	1	3	2
38	1	1	0	0	1	0	1		0	0	2	0
39	2	1	1	0	0	1	1		1	1	0	1
40	0	0	0	0	2	1			2	1	0	1
41	1	0	0	0		0			1	0	0	1
42	0	0	0	1		1			0	1	0	1
43	2	0	0	0		0			0	1	1	0
44	0	0	1	0		1			0	0	0	1
45	0	1	0	0		0			1	0	0	2
46	0	0	0	0		0			2	1	1	0
47	1	0	0	1		0			0	0	1	0
48	1	0	0			0			1	1	0	1
49	0	0	0			0			0	0	0	0
50	0	0	0			0			1	2	0	0
51	1	0	1			0			0	0	2	0
52	0	0				0			0	1	0	0
53	1	0				0			0	1	0	1
54		0				1			0	1	0	0
55		1							1	0	0	1
56		0								1	1	
57		1								1	0	
58		1								0	1	
59										0		
60										1		
61										1		
62										1		
tot	35	35	34	35	35	35	35	35	35	32	35	35

Tabella 1. Serie I. Flussi (o frequenze) $F_{i,h,58}(j)$ dei girini nello stadi 58 (inizio della metamorfosi). L'ultima riga (tot) indica il numero di girini maturati in ciascuna coorte negli esperimenti appartenenti alla serie I [Severini et al., in review].







5.1.2 Andamento delle frequenze cumulate

In figura 4 e 5 sono riportati tre grafici ciascuna in cui si confrontano le frequenze di maturazione cumulate vettore W_j (paragrafo 4.3) delle coorti di $h= 1,3$ (Fig.4) ed $h= 2,4$ (Fig.5) rispettivamente della prima, seconda e terza deposizione. In tutti le coorti esposte sono indicate con cerchi gialle mentre quelle di controllo con cerchi blu. E' possibile notare che a parte la zona centrale del grafico a di Fig. 4 in genere questi presentano cerchi gialli e blu quasi coincidenti, mentre nei grafici di Fig. 5 i cerchi gialli sono sempre al di sotto di quelli blu. Questa è un'indicazione che il campo magnetico di ampiezza maggiore ($73.7 \pm 3.6 \mu\text{T rms}$) ha prodotto nelle coorti ad esso esposte un ritardo superiore di quello dovuto al campo più debole ($71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$).

5.1.3 Andamento dell'indice di sviluppo S_j

In figura 6 viene riportato l'andamento dell'indice di sviluppo S_j (paragrafo 4.3). Nei tre grafici (a,b,c) è proposto il confronto tra l'andamento dello sviluppo delle coorti esposte E nel complesso (cerchi gialli) e quello delle coorti di controllo C (cerchi blu) riguardanti rispettivamente la deposizioni $i=1,2,3$. Anche in questi grafici, il fatto che i cerchi gialli siano sempre al di sotto di quelli blu e che presentino una 'coda' più lunga è testimonianza del ritardo di sviluppo delle coorti esposte rispetto a quelle di controllo.

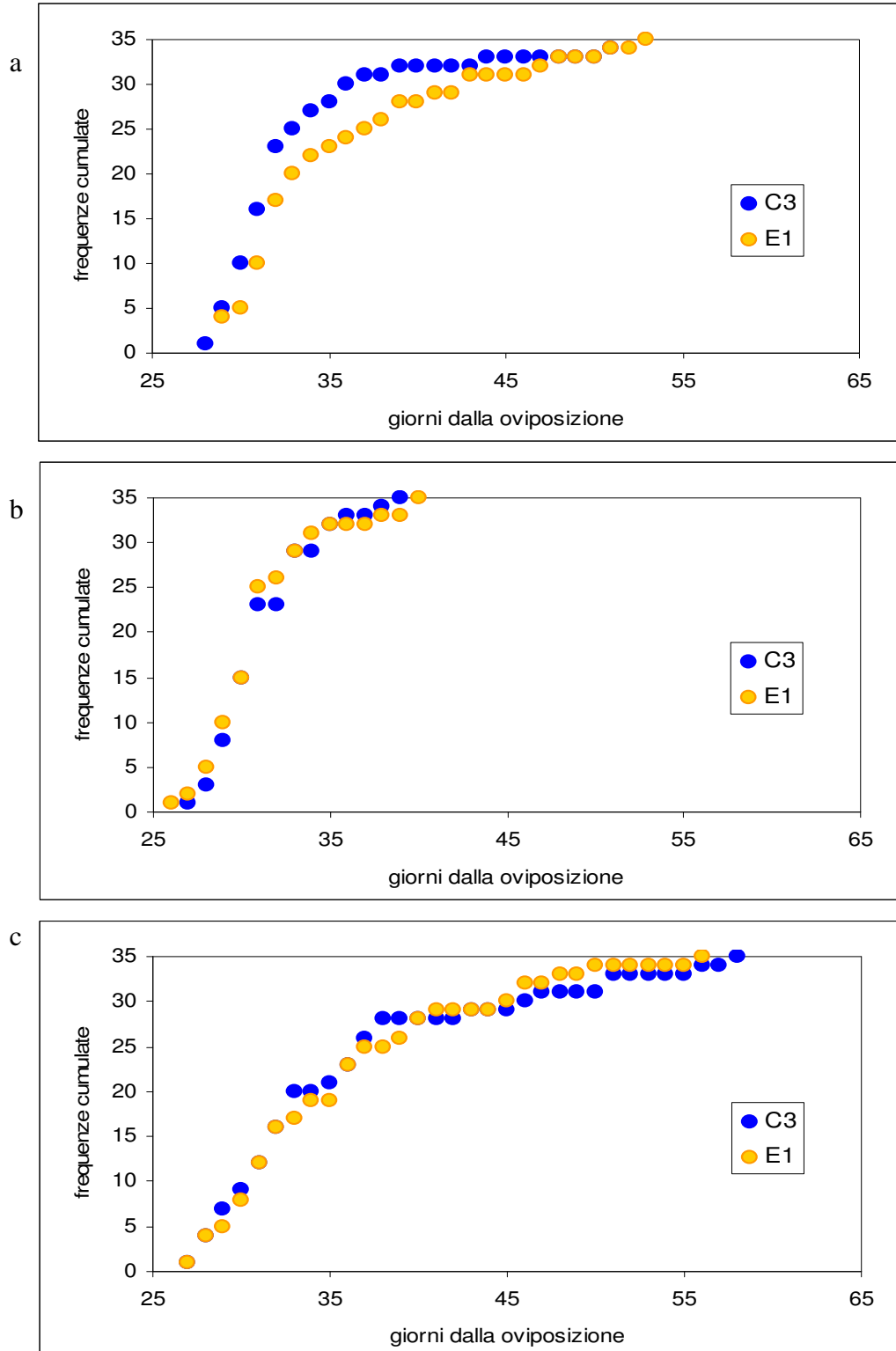


Fig.4. Andamento delle frequenze cumulate W_j . I grafici a, b, e c rappresentano il confronto tra le frequenze cumulate della coorte esposta E al campo magnetico più debole ($71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$) $h=1$ e quelle della prima coorte di controllo (C; $h=3$), rispettivamente per la prima, seconda e terza deposizione. Le coorti esposte sono indicate con cerchi gialli, quelle di

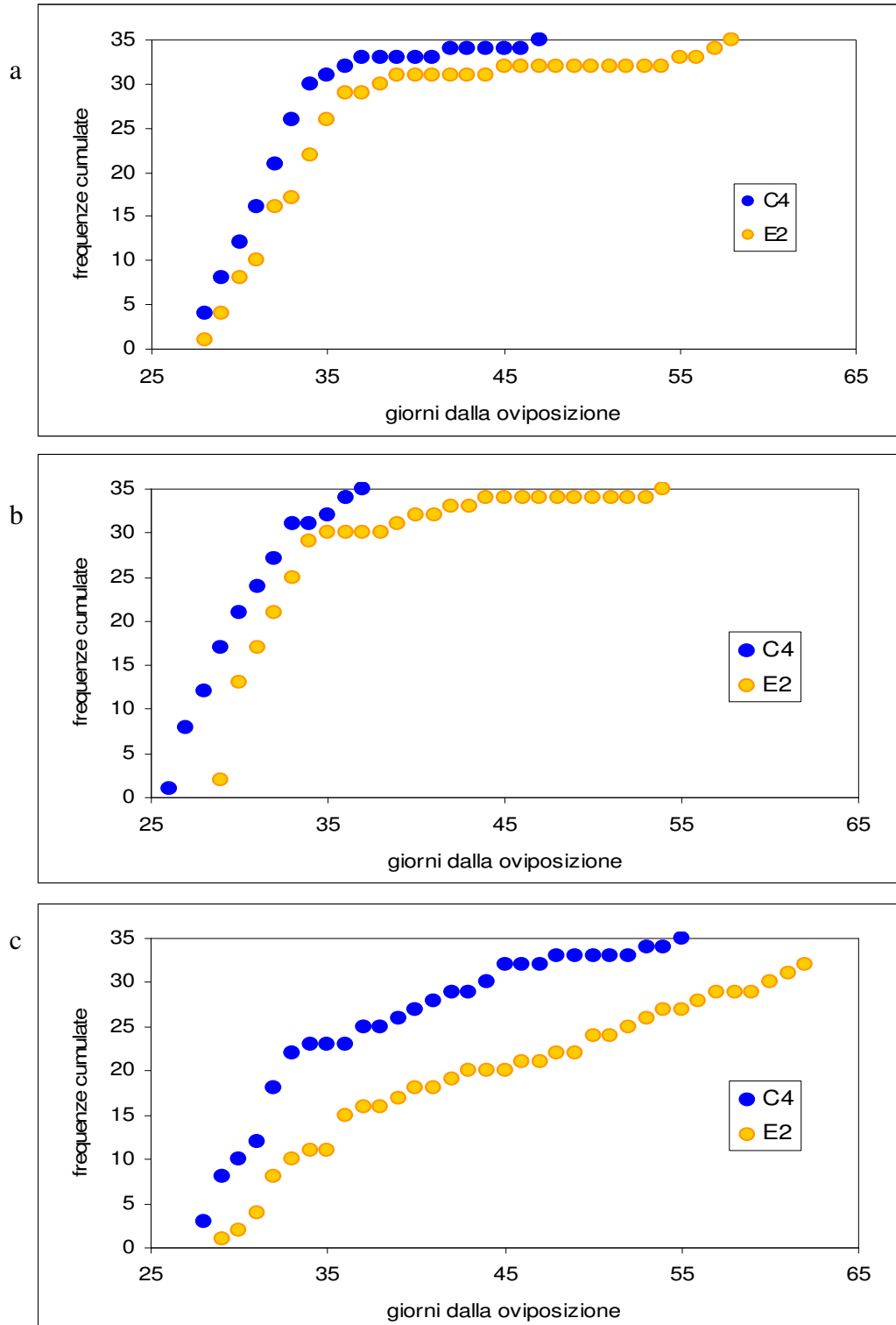
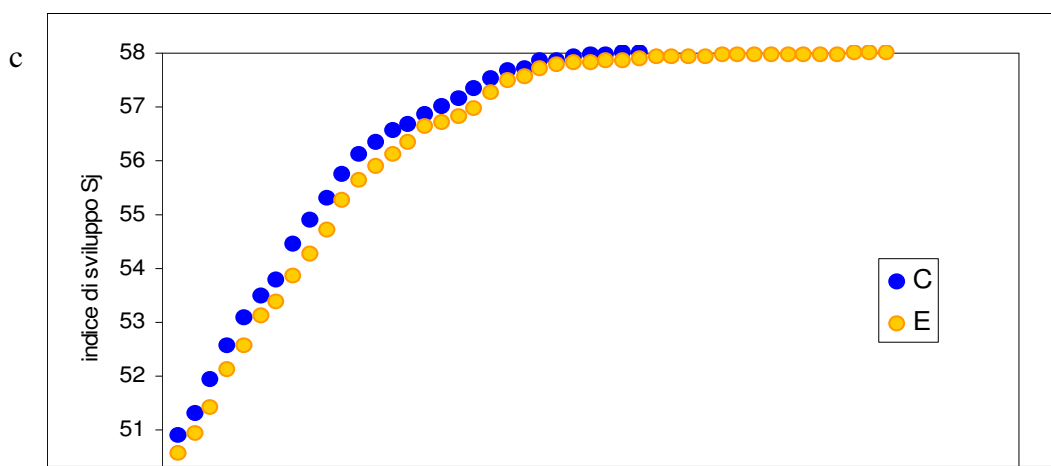
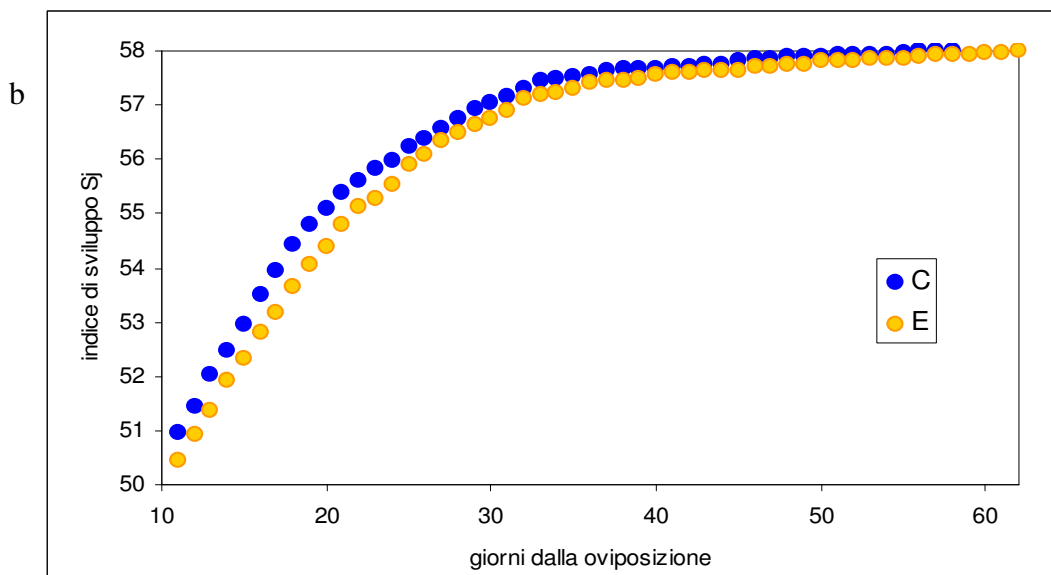
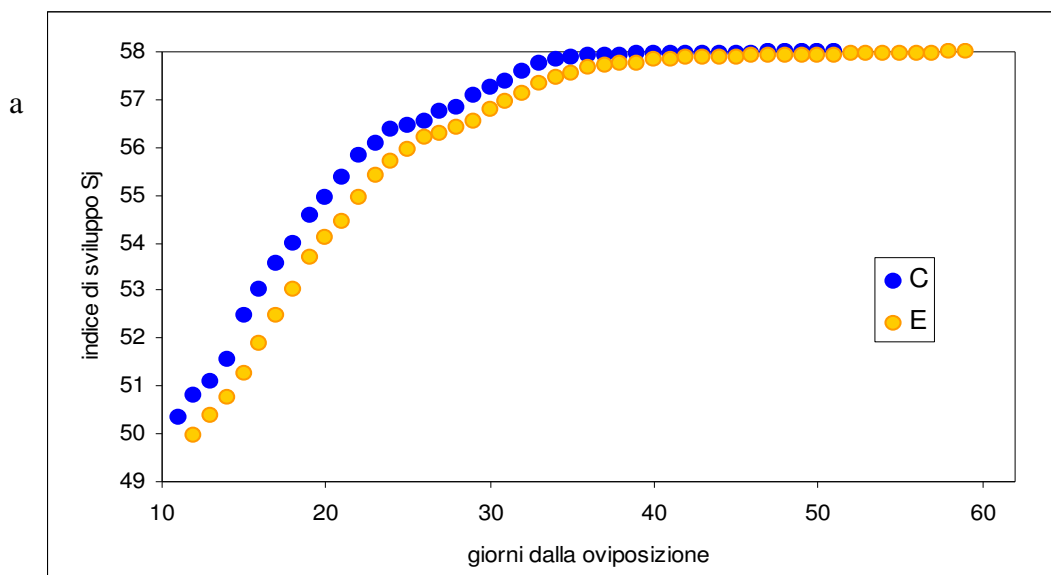


Fig.5. Andamento delle frequenze cumulate W_j . I grafici a, b, e c rappresentano il confronto tra le frequenze cumulate della coorte esposta E al campo magnetico più forte ($73.7 \pm 3.6 \mu T$ rms) $h=2$ e quelle della prima coorte di controllo (C; $h=4$), rispettivamente per la prima, seconda e terza deposizione. Le coorti esposte sono indicate con cerchi gialli quelle di



5.1.4 Analisi statistica dei dati

La tabella 2 mostra i tempi medi di maturazione delle coorti della prima serie di esperimenti per ogni combinazione di deposizione (i) e trattamento (h). Questi tempi risultano maggiori per le coorti esposte rispetto a quelle di controllo. Il fenomeno è maggiormente evidente per la coorte (o trattamento) $h = 2$, il che significa che l'esposizione al campo magnetico più forte ha causato tempi di maturazione più lunghi e maggiori deviazioni standard (SD) in tutte le deposizioni.

deposizioni (i)	trattamento (h)	Tempo medio di maturazione [giorni]	SD	tot
1	1	35.49	6.464	35
	2	35.20	7.459	35
	3	32.82	4.556	34
	4	32.29	3.885	35
2	1	31.26	3.202	35
	2	33.20	5.104	35
	3	31.49	2.780	35
	4	30.20	2.949	35
3	1	35.74	6.985	35
	2	41.97	10.496	32
	3	35.91	8.194	35
	4	35.29	7.246	35

Tab.2. Tempi medi di maturazione delle coorti. SD= deviazione standard, tot= numero di girini maturi [Severini et al., in review].

I risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) a due vie sulle frequenze di maturazione $N_{i,h,58}(j)$ sono riassunti in Tab. 3. Essa mostra che l'interazione tra i due fattori non è significativa, che i tempi di maturazione differiscono ad un alto livello di significatività ($p < .001$) a causa della provenienza dei girini da differenti deposizioni. Nonostante ciò è altamente significativa ($p < .001$) la differenza dei tempi di maturazione a causa del trattamento applicato.

	Somma dei quadrati	GdL	Media dei quadrati	F	p
Intercetta	487323.669	1	487323.669	12747.421	<.001
deposizione	2256.610	2	1128.305	29.514	<.001
trattamento	1020.032	3	340.011	8.894	<.001
interazione	440.337	6	73.389	1.920	.076
casuale	15444.596	404	38.229		
totale	505191.000	416			

Tab.3. ANOVA a due vie. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla [Severini et al., in review].

L'analisi eseguita dimostra che almeno un trattamento dei quattro ha prodotto un ritardo altamente significativo, senza specificare quale trattamento in particolare. Per risolvere la questione ho eseguito un'analisi ulteriore che tiene conto della correzione di Bonferroni (Tab. 4). I risultati mostrano che la differenza di ampiezza del campo magnetico a cui erano esposti i due acquari E1 e E2 (tr. 1 vs. tr. 2) ha causato una differenza significativa ($p < .05$) tra i tempi di maturazione dei girini e la diversità consiste in un anticipo medio di 2.48 giorni delle coorti esposte al campo magnetico più debole. I risultati indicano inoltre che le esposizioni al campo magnetico più debole ($71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$) non ha portato ad un ritardo di maturazione significativo rispetto ai controlli (tr. 1 vs. tr. 3, tr. 1 vs. tr. 4) mentre l'esposizioni al campo più forte ($73.7 \pm 3.6 \mu\text{T rms}$) ha causato un ritardo altamente significativo ($p < 0.001$) di 3.22 giorni rispetto al primo controllo (tr. 2 vs. tr. 3) ed un uguale ritardo altamente significativo ($p < .001$) di 4.05 giorni rispetto al secondo controllo (tr. 2 vs. tr. 4). Non sono risultate significative le differenze nei tempi di maturazione delle coorti di controllo (tr. 3 vs. tr. 4).

trattamento	trattamento	ritardo medio [giorni]	SD	p
tr. 1	tr. 2	-2.48	.860	<.05
	tr. 3	.75	.855	1.000
	tr. 4	1.57	.853	.398
tr. 2	tr. 3	3.22	.862	<.001
	tr. 4	4.05	.860	<.001
tr. 3	tr. 4	.82	.855	1.000

Tab.4. Confronto multiplo secondo la correzione di Bonferroni. SD= deviazione standard; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla [Severini et al., in review].

Analizzando nell'insieme le coorti esposte e quelle di controllo, è possibile eseguire in maniera analoga un test ANOVA a due vie (Tab.5) i cui risultati dimostrano che le prime presentano un ritardo di sviluppo altamente significativo ($P < .001$) di 2,43 giorni rispetto alle seconde.

	somma dei quadrati	GdL	media dei quadrati	F	p
Intercetta	486829.780	1	486829.780	12320.339	<.001
deposizione	2200.979	2	1100.489	27.850	<.001
trattamento	614.668	1	614.668	15.556	<.001
interazione	58.853	2	29.427	.745	.476
casuale	16200.870	410	39.514		
totale	505191.000	416			

Tab.5. ANOVA a due vie. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

5.2 Esperimenti della serie II

Vengono ora esposti i risultati della seconda serie di tre esperimenti nei quali le coorti $h=1,2$ sono state esposte a due combinazioni di campo magnetico variabile rispettivamente (50 Hz, $71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$ e 50Hz, $73.7 \pm 3.6 \mu\text{T rms}$) generato all'interno del solenoide in condizioni di risonanza di ciclotrone del calcio; mentre le due coorti $h=3,4$ sono state impiegate come controlli. In tutte le ripetizioni le quattro coorti risultavano esposte al campo geomagnetico del laboratorio $20,6 \mu\text{T}$, inoltre all'interno del solenoide le coorti esposte erano soggette ad campo statico aumentato fino raggiungere le condizioni di risonanza.

5.2.1 Andamento delle frequenze di maturazione delle coorti

In maniera analoga alla Tab. 1, la successiva tabella 6 fornisce le frequenze di maturazione dei girini, cioè il numero di girini che giornalmente raggiungono lo stadio 58 ($F_{i,h,58}(j)$ paragrafo 4.3) in funzione del tempo j della deposizione i e del trattamento h . Anche questa volta il primo e l'ultimo numero di ogni colonna indicano rispettivamente il primo e l'ultimo girino maturo di ciascuna coorte e considerando il tempo j (prima colonna) si ha l'inizio ed il termine del periodo di maturazione di ciascuna coorte. In questa seconda serie di esperimenti la prima deposizione ha dimostrato di avere uno sviluppo più lento rispetto le altre due. Nell'ultima riga viene indicato il numero totale di girini maturati. Considerando che le coorti erano formate inizialmente da 34, anche in questi esperimenti si può notare che i girini non hanno subito mortalità significativa, sia nelle coorti di controllo che in quelle esposte.

Nelle figure 7,8,9 vengono riportate le distribuzioni delle frequenze di maturazione delle coorti della tabella 6. Ogni figura è costituita da tre grafici (a,b,c) che rappresentano rispettivamente l'andamento delle frequenze di maturazione della coorti $h=1,3$ (Esposta E1 e Controllo C3), delle coorti $h=2,4$ (Esposta E2 e Controllo C4) ed in ultimo quelle

dell'insieme di coorti esposte E, e di controllo C. Dai grafici è possibile notare che lo sviluppo dei girini della prima deposizione è stato il più lento (ultimo girino maturo nel giorno 62), mentre le ultime due deposizioni sono terminate dopo 47 e 46 giorni dall'oviposizione. Analizzando però questi grafici risulta complicato delineare delle differenze nei tempi di sviluppo tra le coorti esposte e quelle di controllo, infatti tranne per quel che riguarda la prima deposizione che ha visto la distribuzione di frequenze della coorte esposta $h=4$ più prolungata nel tempo rispetto a quella del rispettivo controllo, nel complesso le distribuzioni delle coorti esposte e di controllo risultano piuttosto simili tra loro.

J	SERIE II											
	deposizione i=1				deposizione i=2				deposizione i=3			
	esposti h=1,2		controlli h=3,4		esposti h=1,2		controlli h=3,4		esposti h=1,2		controlli h=3,4	
	$F_{1,1,58}(j)$	$F_{1,2,58}(j)$	$F_{1,3,58}(j)$	$F_{1,4,58}(j)$	$F_{2,1,58}(j)$	$F_{2,2,58}(j)$	$F_{2,3,58}(j)$	$F_{2,4,58}(j)$	$F_{3,1,58}(j)$	$F_{3,2,58}(j)$	$F_{3,3,58}(j)$	$F_{3,4,58}(j)$
26												
27						1						
28	1	1	1	1	1	1	2	2	1			
29	1	0	0	1	0	1	2	1	2	2	2	2
30	1	3	2	1	2	3	1	4	3	1	1	2
31	3	1	1	2	4	2	4	3	2	3	3	2
32	4	4	4	5	3	5	6	5	2	5	5	5
33	3	3	6	1	5	4	4	3	2	2	2	3
34	2	3	3	3	6	4	5	4	4	2	5	5
35	3	0	4	5	3	2	2	1	2	2	1	3
36	2	2	4	3	3	3	2	5	3	2	4	2
37	2	3	3	2	2	1	2	4	3	2	3	2
38	2	2	0	1	2	1	1	1	3	2	2	2
39	2	4	1	3	2	1	1	0	2	3	2	2
40	2	1	0	0	0	2	1	0	1	2	0	2
41	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
42	0	0	0	2	1	1	0	0	1	2	0	1
43	1	1	1	0		0	0	0	1	2	1	0
44	0	0	0	1		1	1	0	0	1	1	1
45	0	0	0	0		0		0	1		0	
46	0	0	0	0		0		1			1	
47	1	1	0	0		1						
48	0	1	1	0								
49	0	0		1								
50	0	0										
51	0	0										
52	0	0										
53	0	0										
54	1	0										
55		0										
56		0										
57		1										
58		0										
59		0										
60		0										
61		0										
62		1										
tot	32	33	32	33	34	33	34	34	34	34	34	34

Tabella 6. Serie II. Flussi (o frequenze) $F_{i,h,58}(j)$ dei girini nello stadi 58 (inizio della metamorfosi). L'ultima riga (tot) indica il numero di girini maturati in ciascuna coorte negli esperimenti appartenenti alla serie II.

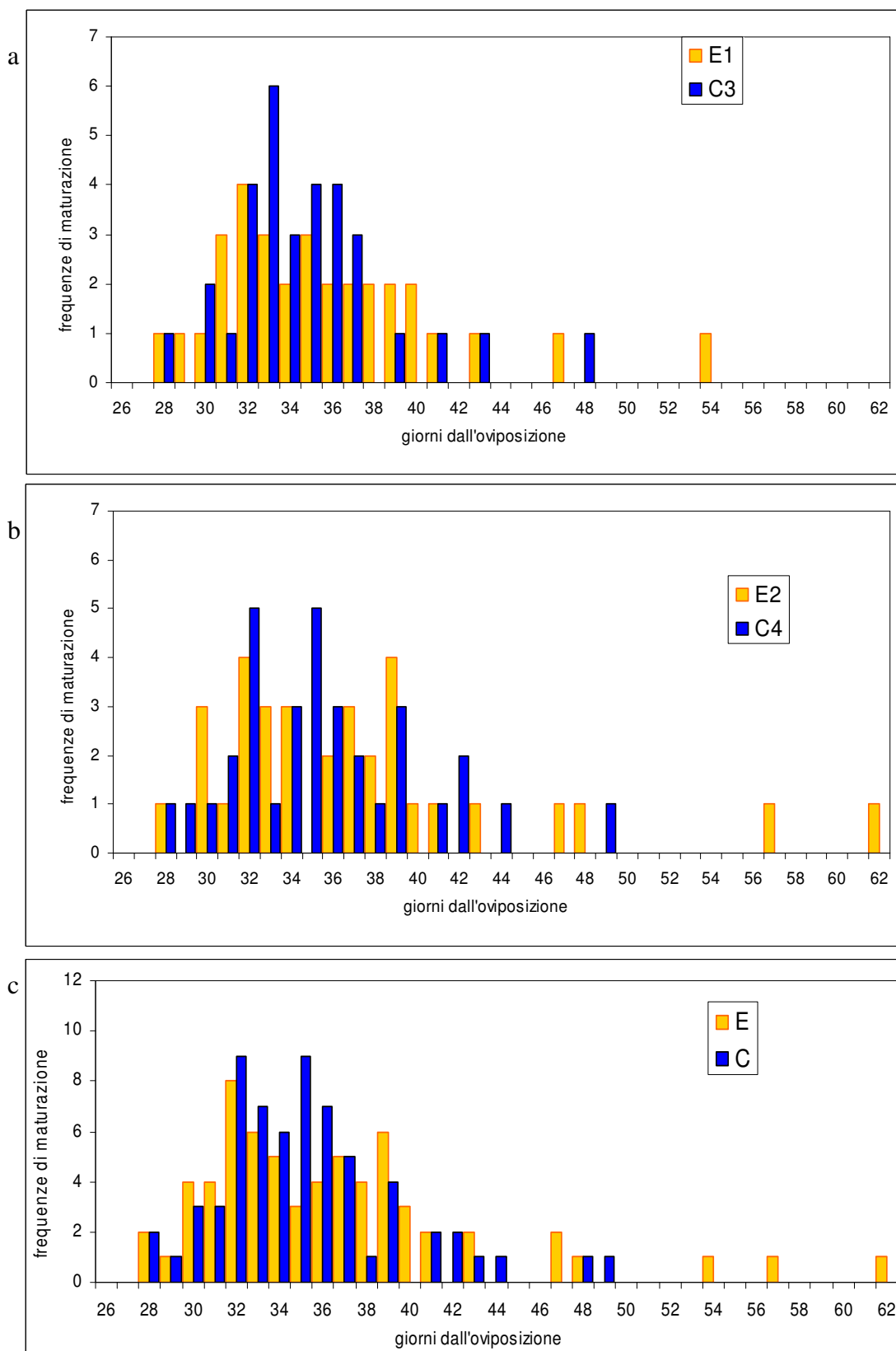
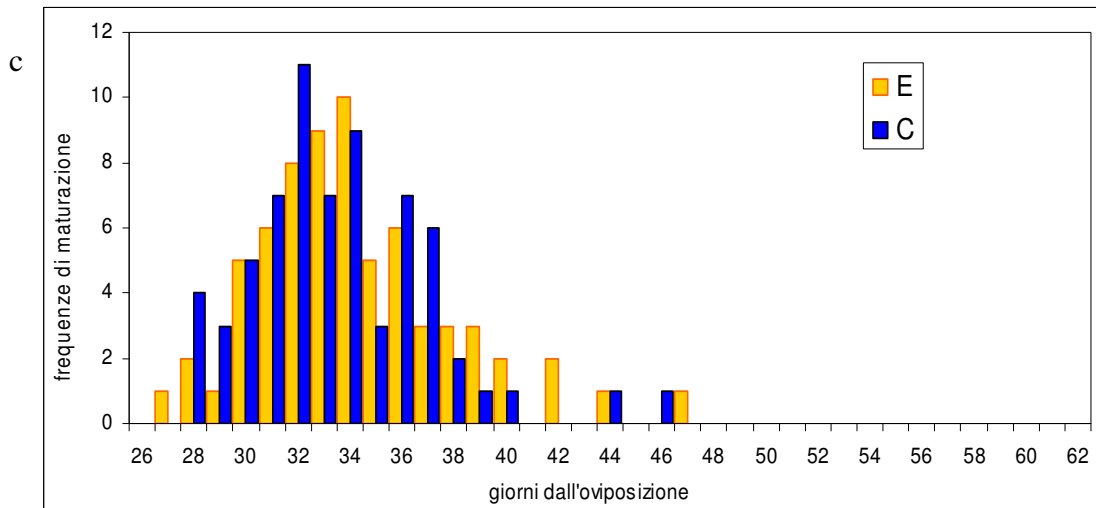
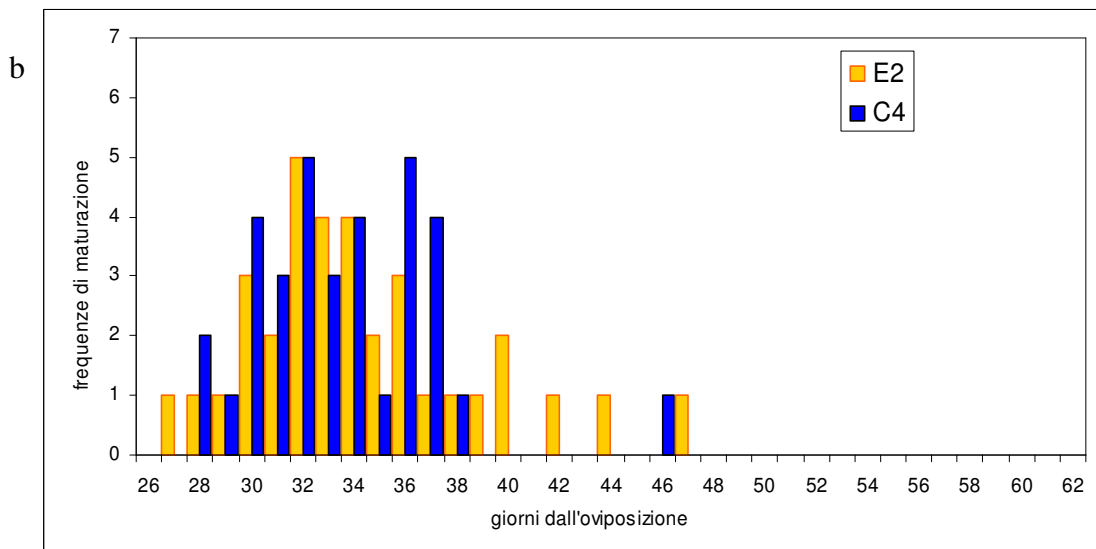
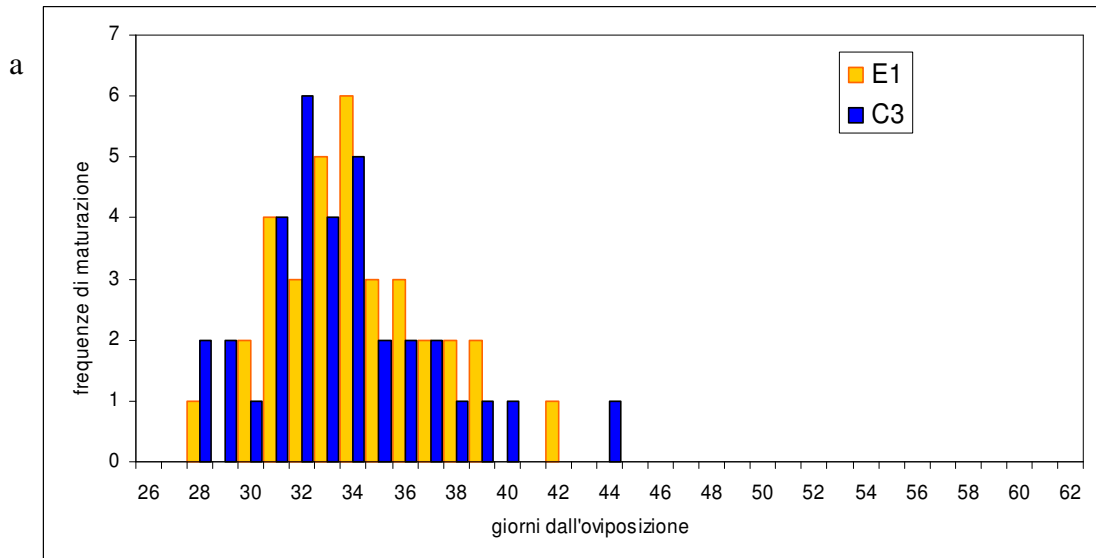


Fig.7. Andamento delle frequenze di maturazione della deposizione $i=1$. a) In alto sono



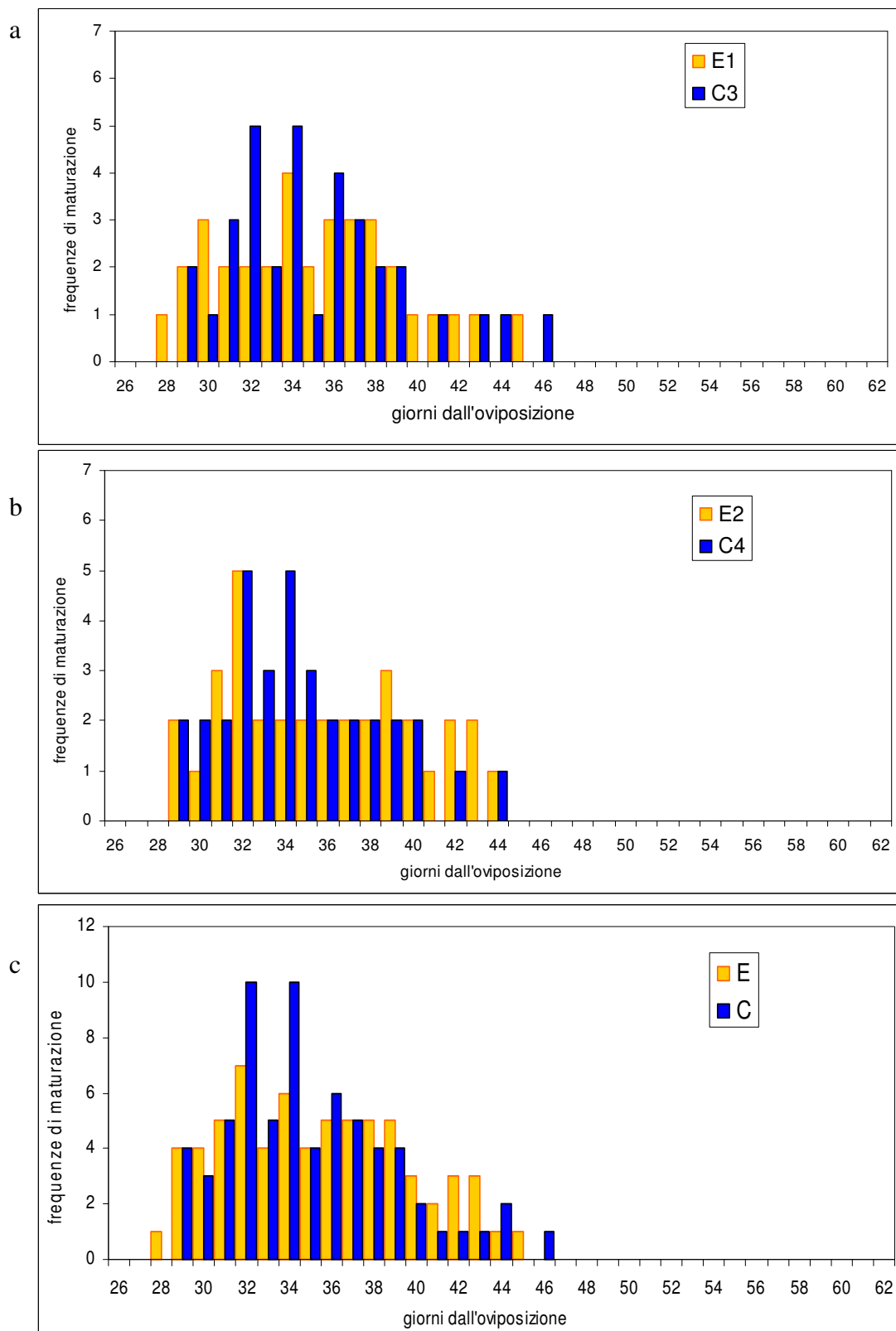


Fig.9. Andamento delle frequenze di maturazione della deposizione $i=3$. a) In alto sono

5.2.2 Andamento delle frequenze cumulate

In figura 10 e 11 sono riportati tre grafici ciascuna in cui si confrontano le frequenze di maturazione cumulate vettore W_j (paragrafo 4.3) delle coorti di $h= 1,3$ (Fig.10) ed $h= 2,4$ (Fig.11) rispettivamente della prima, seconda e terza deposizione della seconda serie di esperimenti. In tutti le coorti esposte sono indicate con cerchi gialle mentre quelle di controllo con cerchi blu. Anche i questa seconda serie di esperimenti è possibile notare in genere i grafici di Fig 10 presentano cerchi gialli e blu quasi coincidenti, mentre nei grafici di Fig. 11 i cerchi gialli sono sempre al di sotto di quelli blu, sebbene le differenze siano inferiori a quelle osservate nella prima serie di esperimenti. Questo può comunque indicare che il campo magnetico di ampiezza maggiore ($73.7 \pm 3.6 \mu\text{T rms}$) ha prodotto nelle coorti ad esso esposte un effetto superiore di quello dovuto al campo più debole ($71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$).

5.2.3 Andamento dell'indice di sviluppo S_j

In figura 12 viene riportato l'andamento dell'indice di sviluppo S_j (paragrafo 4.3). Nei tre grafici (a,b,c) è proposto il confronto tra l'andamento dello sviluppo delle coorti esposte E nel complesso (cerchi gialli) e quello delle coorti di controllo C (cerchi blu) riguardanti rispettivamente la deposizioni $i=1,2,3$. Anche in questi grafici il fatto che i cerchi gialli siano sempre al di sotto di quelli blu e che presentino una 'coda' più lunga è testimonianza del ritardo di sviluppo delle coorti esposte rispetto a quelle di controllo. A differenza dell'analogia Fig. 6 riguardante gli indici di sviluppo delle coorti dei primi tre esperimenti, in questi grafici i cerchi gialli coincidono per la maggior parte con i cerchi blu, il che significa che lo sviluppo tra coorti esposte e di controllo è proceduto in maniera simile, anzi nell'ultima deposizione sembra che le coorti esposte siano maturate più velocemente.

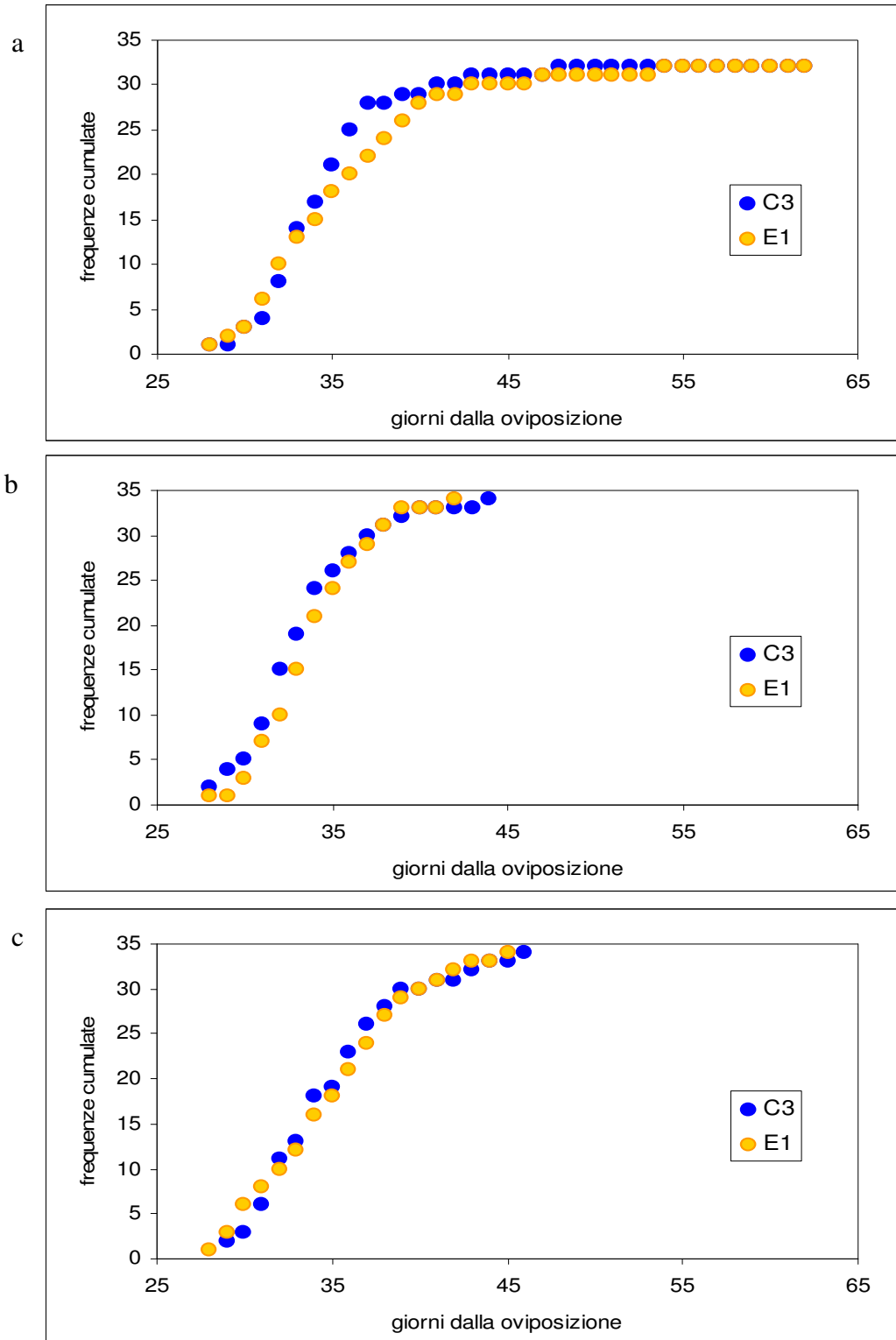


Fig.10. Andamento delle frequenze cumulate W_j . I grafici a, b, e c rappresentano il confronto tra le frequenze cumulate della coorte esposta E al campo magnetico più debole ($71.1 \pm 6.2 \mu\text{T rms}$) $h=1$ e quelle della prima coorte di controllo (C; $h=3$), rispettivamente per la prima, seconda e terza deposizione. Le coorti esposte sono indicate con cerchi gialli quelle di controllo C con cerchi blu

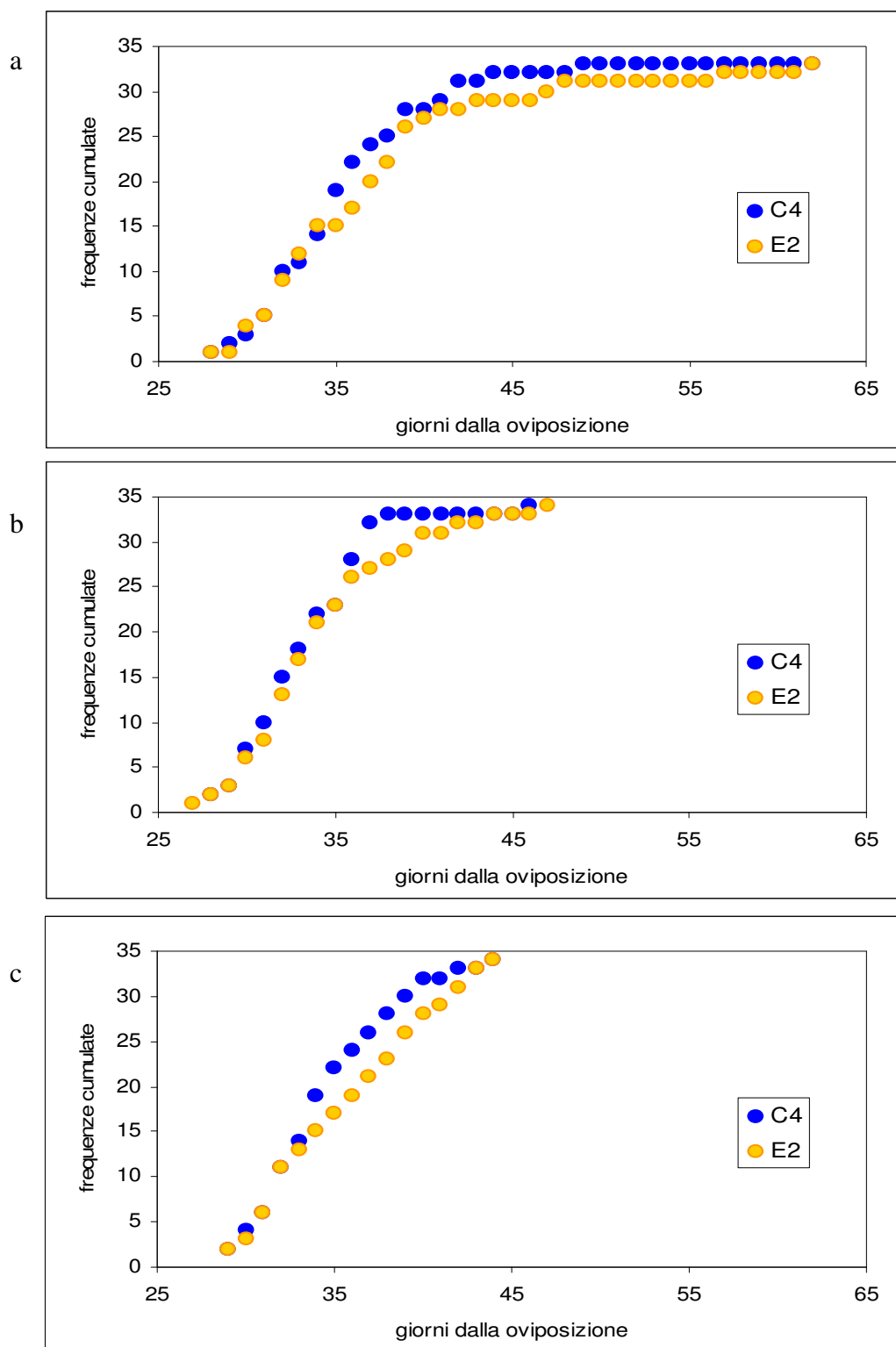
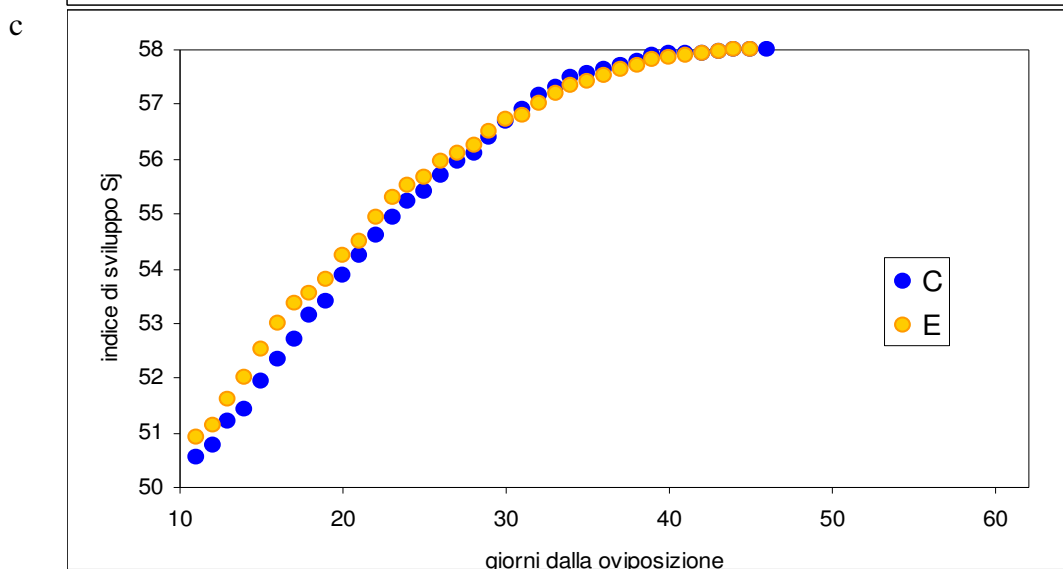
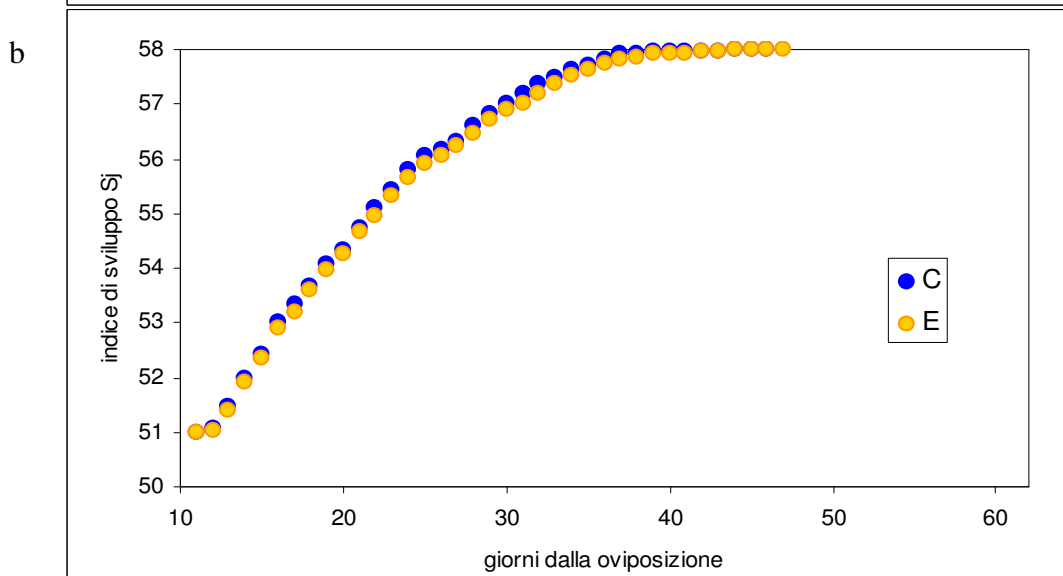
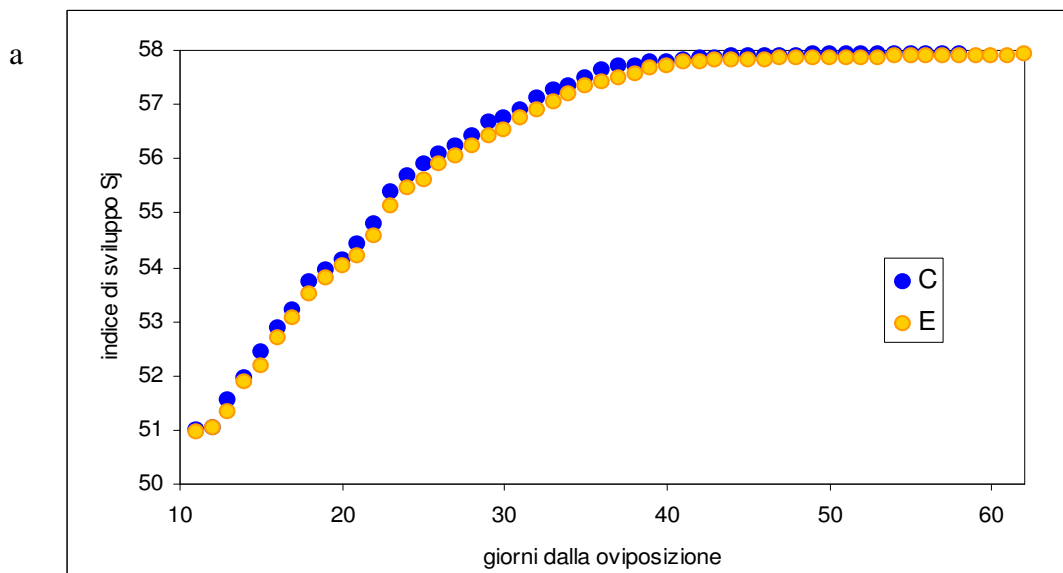


Fig.11. Andamento delle frequenze cumulate W_j . I grafici a, b, e c rappresentano il confronto tra le frequenze cumulate della coorte esposta E al campo magnetico più forte ($73.7 \pm 3.6 \mu\text{T rms}$) $h=2$ e quelle della prima coorte di controllo (C; $h=4$), rispettivamente per la prima, seconda e terza deposizione. Le coorti esposte sono



5.2.4 Analisi statistica dei dati

La tabella 7 mostra i tempi medi di maturazione delle coorti della seconda serie di esperimenti per ogni combinazione di deposizione (i) e trattamento (h). Questi tempi risultano maggiori per le coorti esposte rispetto a quelle di controllo. Il fenomeno è maggiormente evidente per la coorte (o trattamento) $h = 2$, il che significa che l'esposizione al campo magnetico più forte ha causato tempi di maturazione più lunghi e maggiori deviazioni standard (SD) in tutte le deposizioni.

deposizioni (i)	trattamento (h)	Tempo medio di maturazione [giorni]	SD	tot
1	1	35.78	5.3985	32
	2	37.30	7.4224	33
	3	34.78	3.9245	32
	4	35.58	4.5486	33
2	1	34.12	3.0127	34
	2	34.38	4.4858	34
	3	33.50	3.4750	34
	4	33.53	3.5695	34
3	1	35.18	4.2815	34
	2	35.85	4.4185	34
	3	35.14	4.1570	34
	4	34.70	3.7053	34

Tab.7. Tempi medi di maturazione delle coorti. SD= deviazione standard, tot= numero di girini maturi.

I risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) a due vie sulle frequenze di maturazione $N_{i,h,58}(j)$ sono riassunti in Tab. 8. Essa mostra che l'interazione tra i due fattori non è significativa e che i tempi di maturazione differiscono ad un alto livello di significatività ($p < .001$) a causa della provenienza dei girini da differenti deposizioni. Tuttavia, dall'analisi la differenza nei tempi di maturazione dovuta al trattamento applicato non è risultata significativa. Pertanto i risultati indicano che non ci sono state differenze negli effetti delle esposizioni alle due combinazioni di campo magnetico in condizioni di risonanza di ciclotrone dello ione calcio.

	Somma dei quadrati	GdL	Media dei quadrati	F	p
Intercetta	491842.908	1	491842.908	24401.232	<.001
deposizione	272.439	2	136.220	6.758	.001
trattamento	115.591	3	38.530	1.912	.127
interazione	37.681	6	6.280	.312	.931
casuale	7861.027	390	20.156		
totale	500107.000	402			

Tab.8. Test ANOVA a due vie. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

Analizzando però le coorti esposte e quelle di controllo nell'insieme e non singolarmente, il test ANOVA a due vie fornisce i risultati della tabella 9. I quali dimostrano che le prime presentano un ritardo medio di sviluppo significativo ($P<.05$) rispetto alle seconde. Dalle differenze tra i tempi medi di sviluppo riportati in Tab. 10 si ricava un ritardo medio di 0,86 giorni dei girini esposti rispetto ai controlli.

	somma dei quadrati	GdL	media dei quadrati	F	p
Intercetta	491966.398	1	491966.398	24594.596	<.001
deposizione	274.522	2	137.261	6.862	.001
trattamento	80.932	1	80.932	4.046	.045
interazione	11.374	2	5.687	.284	.753
casuale	7921.199	396	20.003		
totale	500107.000	402			

Tab.9. Test ANOVA a due vie. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

deposizioni (i)	trattamento (h)	Tempo medio di maturazione [giorni]	SD	tot
1	0	35.18	4.2386	65
	1	36.55	6.5001	65
2	0	33.51	3.4962	68
	1	34.25	3.7946	68
3	0	34.92	3.9144	68
	1	35.51	4.3313	68

Tab.10. Tempi medi di maturazione delle coorti. SD= deviazione standard, tot= numero di girini maturi. Trattamento 0= controllo, trattamento 1= esposti.

5.3 Analisi statistica del ritardo al giorno $j=22$

Nei paragrafi precedenti sono stati analizzati i tempi di sviluppo dei girini (esposti e non al campo magnetico) considerando le frequenze di maturazione ($F_{i,h,58}(j)$ paragrafo 4.3), ossia le frequenze di raggiungimento dello stadio 58 (preludio al climax metamorfico). E' probabile che il ritardo osservato al termine dello stadio larvale dovuto all'esposizione prolungata (circa due mesi) al campo magnetico, sia evidenziabile (se

presente) anche in fasi precoci dello sviluppo. Per questo motivo ho deciso di verificare se l'effetto del campo magnetico era già presente tre settimane dopo l'oviposizione, analizzando il valore dell'indice di sviluppo S_j relativo alle osservazioni effettuate il giorno $j=22$ di entrambe le serie di esperimenti.

In Tab. 11 sono riportati i valori di S_j delle coorti di controllo (trattamento 0) e delle coorti esposte (trattamento 1) nell'insieme, degli esperimenti della prima e della seconda serie. Nelle successive tabelle 12 e 13 sono riportati i risultati del test ANOVA a due vie effettuate sullo stadio di sviluppo raggiunto dalle coorti rispettivamente della prima e seconda serie di esperimenti. Per quanto riguarda la prima serie di esperimenti (Tab. 12), il risultato dell'analisi evidenzia la presenza di differenze altamente significative imputabili sia alle deposizioni che al trattamento ($P<.001$) che si traduce in un ritardo medio delle coorti esposte di circa metà stadio rispetto ai controlli. Dato che alla temperatura di 24°C i girini impiegano circa 6 giorni per passare dallo stadio 55 al 56 (paragrafo 3.2) [Nieuwkoop & Faber, 1956], una differenza di metà stadio si può interpretare come un ritardo di circa 3 giorni. Nel caso degli esperimenti della seconda serie (Tab. 13) il test ANOVA invece non evidenzia differenze significative imputabili al trattamento applicato. Ciò conferma il fatto che il campo magnetico in condizioni di risonanza di ciclotrone produce un effetto minore dello stesso campo non in risonanza.

Deposizione (i)	Trattamento (h)	Serie I			Serie II		
		S_j	SD	tot	S_j	SD	tot
1	0	55.81	.430	69	54.79	.612	68
	1	55.39	.644	70	54.66	.874	68
2	0	56.10	.347	70	55.11	.585	68
	1	55.61	.666	70	54.97	.690	68
3	0	55.61	.708	70	54.83	.579	66
	1	55.13	1.145	68	54.85	.739	68

Tab.11. Indice di sviluppo al giorno $J=22$. SD= deviazione standard, tot= numero di girini maturi. Trattamento 0= controllo, trattamento 1= esposti.

	Soma dei quadrati	GdL	Media dei quadrati	F	p
Intercetta	1289389.520	1	1289389.520	2618060.250	<.001
deposizione	16.298	2	8.149	16.546	<.001
trattamento	22.491	1	22.491	45.667	<.001
interazione	.078	2	.039	.079	.924
casuale	202.417	411	.492		
Totale	1289872.000	417			

Tab.12. Test ANOVA a due vie. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

	Soma dei quadrati	GdL	Media dei quadrati	F	p
Intercetta	1220917.372	1	1220917.372	2575232.717	.000
deposizione	7.906	2	3.953	8.338	.000
trattamento	.056	1	.056	.118	.731
interazione	5.040	2	2.520	5.316	.005

Tab.13. Test ANOVA a due vie. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

6 PARTE II: ESPERIMENTI CAMPI A BASSA FREQUENZA E MELATONINA

6.1 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metossitriptamina) è una indolamina derivata dal triptofano ed ha diversi ruoli fisiologici. chiariti soprattutto nei Mammiferi, tra i quali quello ormonale: in qualità di messaggero endocrino ha un ruolo centrale nella regolazione dei ritmi circadiani, al quale si aggiunge una funzione regolativa della maturazione sessuale (attività gonadostatica che si identifica in una inibizione della secrezione di LH), dell'attività riproduttiva (nei Mammiferi a riproduzione stagionale) ed un'attività antitiroidea (nei Mammiferi tramite inibizione della secrezione di TSH). Oltre alla funzione endocrina, la melatonina ha anche il ruolo di mediatore locale (ad esempio nella retina. dove la melatonina presenta un ciclo circadiano analogo a quello epifisario e che coordina vari processi tra cui le variazioni di fotosensibilità. il ricambio dei dischi nei fotorecettori e la proliferazione cellulare in vari distretti dell'occhio), di antiossidante e di neutralizzazione di radicali liberi [Reiter, 1998]. Nei Mammiferi la concentrazione di melatonina plasmatica è riconducibile primariamente alla secrezione epifisaria: altre sedi di sintesi della melatonina in questa classe sono la retina (come in tutti i vertebrati), la ghiandola di Harder e la mucosa gastrointestinale (cellule enterocromoaffini) [Bubenik & Pang, 1997]. Nella retina la melatonina ha sicuramente il ruolo di mediatore locale, mentre rimangono da determinare i ruoli e le relazioni con i livelli ematici della melatonina prodotta a livello delle altre sedi extrapineali. Nei Mammiferi la secrezione di melatonina epifisaria presenta una ciclicità circadiana ben caratterizzata, nella quale lo “Zeitgeber”, o fattore ambientale di sincronizzazione, è rappresentato dal fotoperiodo. In virtù del ciclo circadiani epifisario i livelli plasmatici di melatonina si elevano durante la fase oscura del fotoperiodo (scotofase) e si mantengono bassi durante la fase luminosa (fotofase). Si individuano tre diversi modelli di base nelle variazioni circadiane della concentrazione della melatonina plasmatica in questa Classe: in uno la concentrazione cresce linearmente dall'inizio della scotofase, raggiunge un massimo alla media scotofase per poi decrescere

linearmente fino ai livelli basali alla fine di questo periodo; in un altro la concentrazione si mantiene ai livelli basali della fotofase nella prima metà della scotofase, mentre nella seconda si verifica un picco; nell'ultimo caso la concentrazione cresce molto rapidamente dall'inizio della scotofase, si mantiene elevata e costante, formando un ampio plateau e poco prima della fine della scotofase crolla improvvisamente ai livelli basali. Il controllo endogeno, o "orologio biologico" che presiede a questo ritmo circadiano è localizzato in un nucleo ipotalamico, il nucleo soprachiasmatico. Il ritmo circadiano che ha origine in questo nucleo viene sincronizzato al fotoperiodo tramite la retina e controlla la secrezione epifisaria mediante un ganglio autonomo, il ganglio cervicale superiore. Le informazioni relative al fotoperiodo giungono al nucleo soprachiasmatico tramite due vie: la via retino-ipotalamica ed una via che decorre tramite il tratto ottico accessorio inferiore (non è stata ancora fornita una adeguata spiegazione di questa ridondanza). Il nucleo soprachiasmatico agisce, attraverso il tronco encefalico ed il midollo spinale, sul ganglio cervicale superiore inibendo le fibre postgangliari adrenergiche che dal ganglio autonomo raggiungono i pinealociti. Durante le più intense attività secretorie della scotofase, nei pinealociti la stimolazione adrenergica ad opera del ganglio cervicale superiore, mantiene attiva la via dell'adenilato ciclastasi e gli alti livelli di cAMP che ne derivano, a loro volta mantengono attivi i due enzimi che costituiscono i due punti di regolazione della sintesi della melatonina dal triptofano: N-Acetiltransferasi (NAT sito principale) e idrossimetiltransferasi (HIOMT sito accessorio). La stimolazione luminosa della retina induce una stimolazione inibitoria da parte del nucleo soprachiasmatico sul ganglio cervicale superiore che si risolve in un abbassamento dei livelli di cAMP nei pinealociti e nella riduzione della secrezione di melatonina.

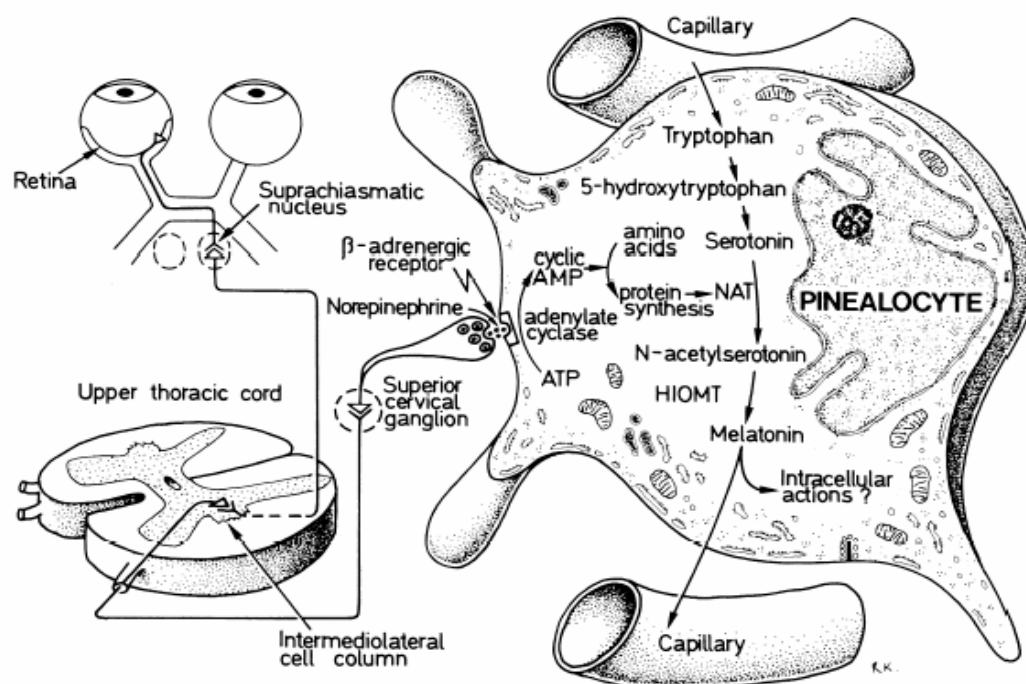


Fig. 1. Schema delle connessioni tra occhi e ghiandola pineale che mostra la localizzazione dell'orologio biologico nel nucleo soprachiasmatico superiore [Reiter, 1998].

6.1.1 La melatonina negli Anfibi

Per quanto riguarda gli Anfibi le sedi di sintesi della melatonina sono rappresentate dall'epifisi, dalla retina e dal canale alimentare (stomaco ed intestino) [Bubenik & Pang, 1997]. Negli Anfibi, ed in generale negli invertebrati inferiori, le relazioni tra sintesi di melatonina nelle diverse sedi e livelli plasmatici di questo ormone non sono ancora chiare. Benché la melatonina retinica svolga una funzione paracrina anche negli Anfibi, in questa ed in altre classi di vertebrati inferiori, essa può contribuire per più della metà ai livelli plasmatici [Delgado & Vivien-Roels, 1989]. Per quanto riguarda la melatonina di origine gastrointestinale, il fatto che sia stata dimostrata la sua esistenza negli Anfibi (anuri ed urodeli), accanto ad evidenze del suo contributo ai livelli plasmatici in altri vertebrati inferiori (i coccodrilli che non hanno ghiandola pineale presentano valori plasmatici analoghi a quelli degli altri tetrapodi ma senza variazioni circadiani; nel *Carassius* (pesce rosso) la pinealectomia combinata a enucleazione bilaterale produce livelli plasmatici di melatonina stazionari che non decrescono durante la fotofase), lascia irrisolto il problema delle sue relazioni con i valori plasmatici in questa classe [Bubenik & Pang, 1997]. Malgrado l'indeterminazione della sua origine, la melatonina plasmatici negli Anfibi, come

nei Mammiferi, presenta dei cicli circadiani sincronizzati sul fotoperiodo, con valori elevati durante la scotofase e bassi nella fotofase.

Circa la regolazione di questo ciclo circadiani non sono state effettuate ricerche esaustive; Green e collaboratori [Green et al., 1999] hanno dimostrato in vitro in *Xenopus* un ciclo circadiano di sintesi della melatonina nell'epifisi e nella retina all'inizio della loro morfogenesi (stadio 26 secondo [Nieuwkoop & Faber, 1956]) ed all'inizio della vita larvale (stadio 47), ma in letteratura mancano studi relativi ai successivi stadi larvali. Nell'ipotesi di un prevalente contributo epifisario alle variazioni plasmatiche circadiane di melatonina, l'esistenza in *Xenopus* ed in generale negli Anfibi di cellule fotorecetttrici nell'epifisi e nell'organo frontale ad essa annesso, accanto all'evidenza presentata da Charlton [Charlton, 1968] di una loro esclusiva attività di sintesi di melatonina in questo organo, lascia pensare ad un sistema di regolazione del ciclo circadiano in qualche modo diverso da quello presente nei Mammiferi. La fotorecezione epifisaria, che su base anatomocomparativa è un carattere ancestrale, potrebbe svincolare l'epifisi dalle informazioni fotoperiodiche di origine retinica. D'altra parte non risultano in questo senso dalla letteratura attualmente a nostra disposizione relazioni funzionali tra epifisi e nucleo soprachiasmatico in *Xenopus*. Laddove nei Mammiferi il centro della regolazione circadiana è localizzato in questo nucleo ipotalamico, la dimostrazione in vitro di questo ritmo circadiano nell'epifisi di *Xenopus*, sia pure in stadi precoci [Green et al., 1999], permette di ipotizzare che primitivamente tale ruolo sia stato ricoperto dalla stessa epifisi e che tale condizione si sia mantenuta negli Anfibi.

Per quanto riguarda le funzioni della melatonina negli Anfibi, in questa classe troviamo molti ruoli analoghi a quelli individuati nei mammiferi: una funzione paracrina nell'occhio e, probabilmente, nella mucosa gastrointestinale, una funzione antiossidante e di neutralizzazione dei radicali liberi ed una funzione gonadostatica. Quest'ultima è stata studiata in particolare negli Anuri (es. *Alytes obstetricans*, *Hyla cinerea*, *Rana pipiens*, *Rana esculenta*). Rimanendo nell'ambito delle funzioni endocrine, la melatonina promuove l'apparizione dei granuli di melanina nei melanofori (nelle larve di *Xenopus* questo effetto viene indotto alla concentrazione di 0.1 µg/ml) eguale nell'ambito della replicazione delle "colorazioni fisiologiche" del tegumento. Una funzione fisiologicamente importante che la melatonina svolge, in qualità di messaggero endocrinonagli Anfibi, è quella di antagonista dell'ormone tiroideo (T_3 , T_4 o tiroxina). Questa funzione antagonista si esplica sia a livello dei bersagli (ad esempio la melatonina rallenta in ritmo la regressione delle code indotta

dalla tiroxina in *Rana pipiens*) [Wright et al., 1991], sia a livello della tiroide, inibendone la secrezione, la proliferazione e la sensibilità al TSH [Wright et al., 1996-97].

Relativamente allo scopo di questa ricerca, l'implicazione più importante di questi effetti antagonisti riguardano il ruolo dell'ormone tiroideo nello sviluppo degli Anfibi: quest'ormone, infatti, è il principale regolatore dello sviluppo larvale in questa Classe. Durante la premetamorfosi, la fase iniziale della vita larvale, i livelli plasmatici di questi ormoni si mantengono bassi; nella successiva prometamorfosi, caratterizzata dallo sviluppo e dall'accrescimento degli arti, con l'instaurarsi dell'asse endocrino ipotalamo-ipofisi-tiroide, si elevano fino ad un picco che coincide con il climax metamorfico, che inizia con la fuoriuscita degli arti anteriori dalle cavità peribranchiali, e termina con il completo riassorbimento della coda. Questa funzione di controllo endocrino dello sviluppo metamorfico svolto dagli ormoni tiroidei è coadiuvato, oltre che dalla melatonina, da altri ormoni: la prolattina, i corticosteroidi e l'ormone della crescita con ruoli sinergici e antagonisti. Con l'eccezione della melatonina, i cui livelli si riducono fortemente all'approssimarsi del climax (un effetto indotto dalla tiroxina [Wright & Alves, 2001]), per poi elevarsi di nuovo a metamorfosi conclusa, tutti gli ormoni coadiuvanti gli ormoni tiroidei, come questi ultimi presentano un picco al climax. Inoltre, tutti gli ormoni che partecipano al controllo dello sviluppo metamorfico presentano dei ritmi circadiani, le cui fasi variano fisiologicamente nel corso dello sviluppo (anche in fotoperiodo costante). Il ruolo della melatonina nello sviluppo metamorfico non è comunque riducibile al solo ruolo di antagonista tiroideo. Alla melatonina viene riconosciuto il ruolo di traduzione dell'informazione fotoperiodica ambientale all'impianto endocrino circadiano. In effetti, nell'ambito dei diversi parametri ambientali che influenzano la velocità di sviluppo (temperatura, disponibilità di spazio e di alimento), il fotoperiodo è uno dei più fortemente condizionanti. Sono state quindi condotte delle ricerche volte a individuare le relazioni tra fotoperiodo, melatonina e velocità di sviluppo. I dati sperimentali attualmente a mia disposizione indicano che l'effetto della lunghezza del fotoperiodo varia a seconda della specie [Wright et al., 1988]; in *Rana pipiens* ed altre specie (*Alytes obstetricans*, *Rana temporaria*, *R. ridibunda*) fotoperiodi lunghi favoriscono, e corti rallentano, lo sviluppo metamorfico; in *Discoglossus pictus* ed in *Xenopus laevis*, fotoperiodi lunghi rallentano, e brevi accelerano, lo sviluppo metamorfico. In particolare in *Xenopus*, in uno studio di Delgado e colleghi [1987] la velocità di sviluppo nella prometamorfosi è, rispetto a quelle in 12L:12D, leggermente maggiore in 24D e drasticamente inferiore in 24L. In un'altra ricerca [Edwards & Pivorun, 1991] lo sviluppo metamorfico si è rivelato più veloce in

1L:23D che in 23L:1D. Questa variabilità potrebbe derivare da una diversa risposta dell'apparato endocrino, nelle diverse specie, ai vari regimi fotoperiodici. Un dato fotoperiodo potrebbe favorire un incremento nei livelli di melatonina in alcune specie, e in altre un decremento [Wright, 2002], ma mancano in letteratura ricerche volte a testare questa ipotesi. Tuttavia gli esperimenti in cui si è somministrata melatonina esogena forniscono un quadro contraddittorio e, anche in una singola specie, la melatonina può accelerare lo sviluppo, ritardarlo o non avere effetto a seconda del fotoperiodo, oppure accelerarlo o ritardarlo a seconda della concentrazione alla quale viene somministrata [Wright, 2002]. In parte queste incongruenze possono essere spiegate con i diversi effetti che le modalità di somministrazione e le dosi diverse, hanno sui livelli plasmatici di melatonina. La melatonina somministrata in dosi nell'ordine del µg/ml, non determina un incremento dei livelli plasmatici, ma può anche determinare una riduzione; in dosi nell'ordine del ng/ml determina un incremento; nell'ordine del pg/ml (concentrazione fisiologica) non ha effetto. Sembra esserci una soglia nell'ambito della concentrazione, sopra la quale la regolazione della melatonina plasmatica porta negli animali trattati i livelli di melatonina al di sotto dei controlli. Quindi l'abbassamento dei livelli plasmatici indotto dalla somministrazione può causare una accelerazione dello sviluppo ed un climax anticipato [Wright, 2002]. D'altra parte il controllo dello sviluppo da parte della melatonina non sembra riconducibile esclusivamente alla durata del periodo del giorno in cui i suoi livelli si mantengono a dati valori, ma probabilmente un ruolo importante viene ricoperto dalle fasi delle sue variazioni circadiane. Secondo una delle teorie sul controllo ormonale della metamorfosi [Meier, 1975], lo svolgimento di questo processo sarebbe guidato da dei campionamenti nelle fasi dei ritmi ormonali. Alla base di questa ipotesi c'è l'aumento che i diversi ormoni che modulano l'azione dell'ormone tiroideo, possono sortire effetti profondamente diversi a seconda che il loro picco si verifica in corrispondenza del punto di minimo nel ritmo dell'ormone tiroideo. Alcune osservazioni sperimentali sostengono questa ipotesi: in *Rana catesbeiana*, in fotoperiodo costante 18L:6D, le fasi della melatonina plasmatica e dell'ormone tiroideo variano tra prometamorfosi e climax [Wright & Racine, 1997]. Poiché lo spostamento di fase della melatonina è specifico per ogni ciclo L:D, potrebbe configurarsi come il parametro della melatonina che media gli effetti del fotoperiodo sulla velocità di sviluppo. Un'altra indicazione è l'evidenza che la prolattina inibisce la metamorfosi solo se somministrata in determinate relazioni temporali con il T₄ [Breaux & Meier, 1971]. L'idea che il fotoperiodo possa influenzare lo sviluppo interagendo, attraverso la melatonina, con un

“timing” endogeno è anche in accordo con i risultati di una ricerca condotta su *Rana pipiens* [Wright et al., 1988]. In questa ricerca le larve di *Rana pipiens* sono state esposte a “giorni” di diverse lunghezze ma caratterizzati dallo stesso rapporto 1:1 tra L:D (9L:9D; 12L:12D; 15L:15D). Nonostante il tempo totale di esposizione alla luce ed al buio siano gli stessi, nelle diverse lunghezze e frequenze del fotoperiodo la velocità di sviluppo è stata diversa. In un’altra ricerca [Wright et al., 1990], condotta sempre su *Rana pipiens* è stata applicata una tecnica detta “risonanza” che consiste nel mantenere fissa la durata della scotofase e incrementare, in cicli successivi, la durata della fotofase e viceversa. Questa tecnica costituisce un protocollo standard per evidenziare il coinvolgimento, relativamente ad un parametro fotoperiodico, di cicli circadiani [Nanda & Hamner, 1958].

In conclusione il ruolo della melatonina nella regolazione endocrina dello sviluppo metamorfico e il suo ruolo relativamente agli effetti del fotoperiodo non sono ancora stati adeguatamente chiariti. Poiché gran parte delle incongruenze nei risultati delle indagini reperibili in letteratura può essere ricondotta al fatto che in queste ricerche si è ricorso in larga parte di esse alla somministrazione di melatonina, piuttosto che determinazione dei suoi ritmi endogeni e mancando in *Xenopus* la dimostrazione sperimentale di un ciclo circadiano nella melatonina plasmatica durante la prometamorfosi, ho ritenuto che una ricerca sugli effetti dei campi ELF sulla melatonina e sulla dinamica di sviluppo larvale in questo modello animale necessiti di una preventiva misura dell’andamento dei valori retinici di quest’ormone in fotoperiodo costante e di una dimostrazione del carattere endogeno dei suoi cicli oscillatori (eventuali). Perciò lo scopo dei due esperimenti eseguiti durante la seconda parte del Dottorato di Ricerca è stato rilevare l’andamento circadiano di sintesi della melatonina nella retina di *Xenopus laevis* negli stadi prometamorfici e di una eventuale alterazione delle concentrazioni di quest’ormone dovuta all’esposizione al campo magnetico emesso da un apparecchio televisivo (ampiezza <20 μ T).

6.2 Protocollo sperimentale

Come per gli esperimenti della prima parte del Dottorato, in ciascun esperimento sono state formate delle coorti da embrioni appartenenti alla stessa deposizione, inducendo la maturazione dei gameti in una coppia di adulti di *X. laevis*, mediante iniezioni di gonadotropina corionica umana (HCG 5.000 U.I.). La somministrazione di HCG è stata effettuata tramite iniezione nel sacco linfatico dorsale: per il maschio, la dose è 400 U.I. in 0.5 ml di soluzione di Holtfreter (soluzione fisiologica per Anfibi) una volta ogni 24 ore per tre giorni; per la femmina, 800 U.I. in 1.0 ml di soluzione di Holtfreter una sola volta,

in concomitanza della terza somministrazione al maschio. La fecondazione delle uova ha avuto luogo in una vasca da riproduzione di 50 l completamente al buio alla temperatura costante di 21.0 ± 0.2 °C. Questa vasca (Fig. 1 paragrafo 4.1), realizzata 'ad hoc', ha una grata a 0.1 m dal fondo sulla quale verranno posti i riproduttori, di modo che le uova fecondate vadano a posarsi in due contenitori posti sul fondo. L'accoppiamento iniziava nel tardo pomeriggio cosicché la deposizione delle prime uova fecondate sarebbe avvenuta intorno alla mezzanotte. Il mattino successivo (giorno $J=1$ di sviluppo), i riproduttori erano rimossi e nei due contenitori sotto la grata, contenenti le uova fecondate in acqua a 21 °C, la temperatura veniva gradualmente aumentata fino a 24 °C. Due giorni dopo ($J=3$) si prelevavano 200 individui (approssimativamente allo stadio 39 di sviluppo) per formare 2 coorti costituite da 100 girini ciascuna da allevare in acquari di vetro di 50 litri, esposti ad un fotoperiodo 12:12.

L'acquario contenente la coorte esposta era posizionato di fronte allo schermo di un apparecchio televisivo, mentre il secondo acquario contenente la coorte di controllo era posto distante dal televisore, in maniera che lo sviluppo dei girini in esso non venisse perturbato dal campo magnetico emesso dalla TV ed esposto unicamente al campo geomagnetico di fondo. Le condizioni di allevamento (temperatura dell'acqua 24°C, disponibilità di acqua 0.5 litri/girino, dieta giornaliera costituita da infuso d'ortica bollita, illuminazione) erano le stesse per tutte le coorti. Il giorno $J=22$ approssimativamente allo stadio di sviluppo 53 [Nieuwkoop & Faber. 1956] è stata effettuata la determinazione dello stadio di sviluppo raggiunto, condotta sistematicamente su tutti gli individui delle coorti. Il giorno $J=25$ sono iniziati i campionamenti di 10 individui per ciascuna coorte, finalizzati alla determinazione dei livelli di melatonina retinica. I campionamenti, due al giorno (uno in fotofase ed uno in scotofase), sono stati distribuiti in maniera casuale durante le 24 ore così da poter ricostruire la curva dell'andamento circadiano di sintesi della melatonina in entrambe le coorti.

Per eseguire l'espanto degli occhi, si è proceduto con un'anestesia dei girini tramite immersione in una soluzione di MS 222. Una volta cessate le attività vitali dei girini campionati è stata effettuata in ciascun occhio un'incisione al microscopio per estrarre il cristallino, mediante aspirazione. Il bulbo oculare è stato quindi espantato per poi essere congelato a -20°C prima dell'analisi successiva. L'occhio è un organo piuttosto stabile per dimensioni all'interno delle specie e con questa tecnica si è ritenuto di poter recuperare integralmente il tessuto oculare nel quale determinare il contenuto di melatonina.

Il lavoro sperimentale è stato eseguito presso lo Stabulario dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo ai sensi del D.L. 116/92.

6.3 Apparato espositivo

L'apparato espositivo impiegato in questa ricerca è il medesimo utilizzato nel lavoro di [Severini et al., 2003] di cui riporto una descrizione sintetica. Come rappresentato in Fig. 1, per evitare il riscaldamento dell'acqua contenuta nell'acquario per conduzione dallo schermo televisivo l'acquario è stato posizionato ad una distanza di circa 0.05 m dallo stesso e su una base differente per limitare la presenza di eventuali vibrazioni. Tra lo schermo e la parete di vetro dell'acquario (ma non in contatto) è stato posto uno strato di PVC ricoperto da una lamina sottile di alluminio collegata a terra. In questo modo è stato possibile evitare che i campi elettrici e le radiazioni infrarosse emessi dall'apparecchio televisivo potessero perturbare lo sviluppo dei girini. All'interno dell'acquario esposto il campo elettrico è stato misurato mediante un misuratore (Wandel & Goltermann EFA-3): col televisore acceso era inferiore a 100 V/m, col televisore spento al di sotto della soglia misurabile dallo strumento.

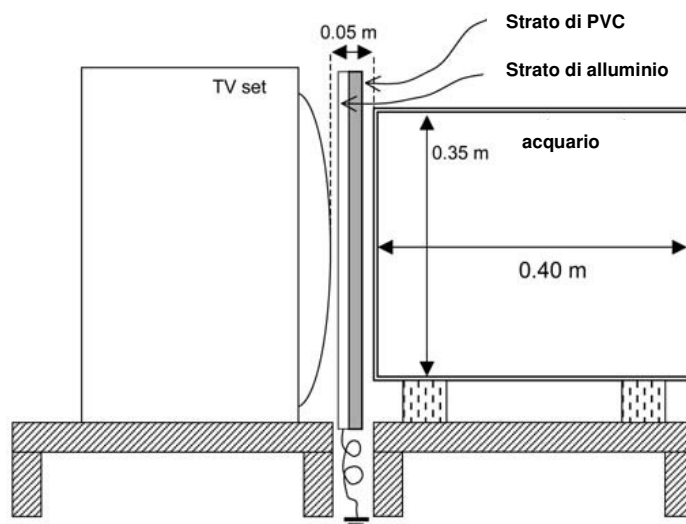


Fig.1 Rappresentazione schematica dell'apparato espositivo [Severini et al., 2003].

Un qualsiasi tipo di televisore con tubo a raggi catodici è dotato di un sistema di deflessione che consente di deviare la traiettoria del pannello di elettroni che va a formare l'immagine sullo schermo. Per sistema di deflessione si intende l'insieme di due campi magnetici variabili, uno orizzontale ed uno verticale, di opportune frequenze ed in fase tra loro. La frequenza del campo magnetico interessato al movimento verticale equivale a

quella di aggiornamento delle immagini del televisore (50 Hz). Quella del campo che produce la deflessione lungo l'asse orizzontale è compresa tra 10 e 20 kHz. Il campo magnetico del televisore usato è stato misurato con un SCL FGM-3: la prima armonica della componente polarizzata orizzontalmente era 50 Hz, quella verticale era 15.797 kHz; i valori delle ampiezze delle componenti orizzontale e verticale all'interno dell'acquario esposto sono rappresentate in Fig. 2.

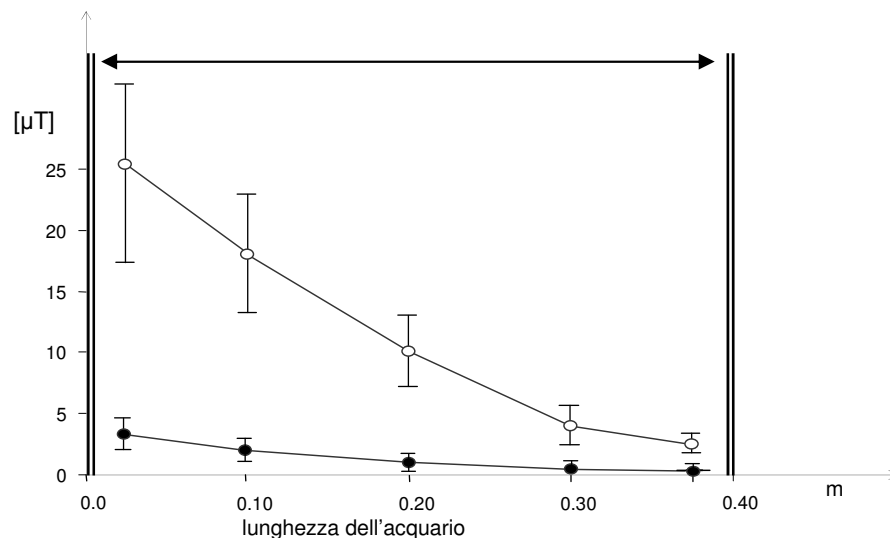


Fig. 2 Valori delle ampiezze della componente orizzontale (cerchi vuoti) e verticale (cerchi pieni) del campo magnetico nell'acquario esposto [Severini et al., 2003].

Per determinare la concentrazione retinica di melatonina si è ritenuto di impiegare il test ELISA (RE54021- IBL-Hamburg, Germania) come descritto in [Bayarri et al., 2002].

Il principio del test si basa sulla competizione tra antigeni biotinilati verso antigeni non biotinilati per un numero fisso di siti anticorpali di legame. La quantità di antigene biotinilato legato all'anticorpo è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita (melatonina) nel campione. Quando il sistema si trova in equilibrio l'antigene libero biotinilato viene lavato via e il complesso antigene biotinilato+anticorpo è rilevato usando un enzima (l'alcalinfosfatasi anti biotina) come marker ed il p-nitrofenilfosfato come substrato. La quantificazione dei campioni si ottiene paragonando l'attività enzimatica del campione rispetto ad una curva preparata usando standards noti. Il test richiede un preventivo passaggio in colonna per l'estrazione dei campioni ed il contenuto del kit si può impiegare per 96 determinazioni suddivise in tre dosaggi separati. Ciascun dosaggio prevede quindi 32 determinazioni che corrispondono a 16 prove indipendenti poiché si consiglia di saggiare i campioni in doppio e di calcolare il valor medio. Di queste 16 prove 12 vengono utilizzate per saggiare 6 standards che sono utilizzati per costruire la

curva su un grafico semilogaritmico e 4 per determinare 2 controlli. Il test, infatti risulta valido, cioè non affetto da errori nella procedura, unicamente quando i due controlli forniti sono compresi negli intervalli previsti.

7 RISULTATI

7.1 Analisi statistica del ritardo al giorno $j=22$

Il giorno $J=22$ di sviluppo (tre settimane dall'oviposizione) è stata effettuata la determinazione dello stadio di sviluppo raggiunto da ciascun individuo delle coorti di entrambi gli esperimenti. Di seguito si riporta la tabella inerente l'indice di sviluppo S_j di ciascuna coorte (Tab. 1), in essa si può osservare che in media i girini (esposti e non) dopo tre settimane dall'oviposizione avevano raggiunto gli stadi 53-54.

trattamento	Esperimento I			Esperimento II		
	N	S_j	SD	N	S_j	SD
0	100	53.54	.558	100	53.92	.774
1	100	53.38	.528	100	53.61	.723

Tab.1. Indice di sviluppo S al giorno $J=22$. SD= deviazione standard, N= numero di girini. Trattamento 0= controllo, trattamento 1= esposti.

Nelle tabelle 2 e 3 è riportata l'analisi della varianza relativa rispettivamente al primo ed al secondo esperimento. Entrambe le analisi evidenziano una differenza

significativa ($P < .05$) già rilevabile dopo tre settimane di sviluppo dovuta all'esposizione al campo magnetico emesso dal televisore (trattamento). Considerando che alla temperatura di 24°C i girini impiegano circa 2 giorni per passare dallo stadio 53 al 54 (paragrafo 3.2) [Nieuwkoop & Faber, 1956], una differenza di metà stadio si può interpretare come un ritardo di circa 1 giorno.

	Somma dei quadrati	GdL	Media di quadrati	F	p
Tra i gruppi	1.280	1	1.280	4.340	.039
Nei gruppi	58.400	198	.295		
Totale	59.680	199			

Tab.2. Test ANOVA ad una via relativa al primo esperimento. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

	Somma dei quadrati	GdL	Media di quadrati	F	p
Tra i gruppi	4.805	1	4.805	8.560	.004
Nei gruppi	111.150	198	.561		
Totale	115.955	199			

Tab.3. Test ANOVA ad una via relativa al secondo esperimento. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

7.2 Grafici primo esperimento

In figura 1 è rappresentato il confronto tra l'andamento della curva dei valori degli standards testati nel primo esperimento (in rosso) e quello dei valori attesi (in nero). Come si osserva dal grafico le densità ottiche (OD) rilevate nell'esperimento sono comprese tra 0.21 e 0.28, questi valori sono risultati circa 10 volte inferiori agli standard attesi e definiti nel certificato di qualità del test. Ciò non ha permesso di trasformare, secondo la curva di sensibilità, i dati di densità ottica in misure di concentrazione di melatonina.

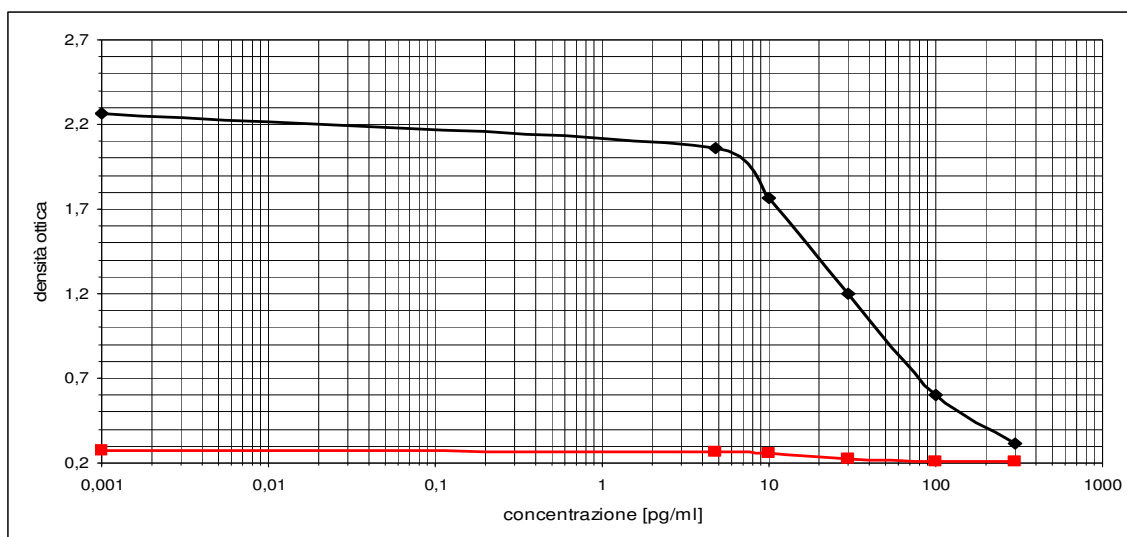


Fig. 1. Andamento dei valori di densità ottica degli standard misurati (in rosso) e attesi (in nero).

Tuttavia, procedendo nel rappresentare l'andamento nel tempo della densità ottiche (Fig. 2) ho ottenuto delle indicazioni interessanti. Infatti, è possibile osservare che sia per i campioni analizzati relativi alla coorte di controllo (in blu) che per quella esposta (in oro) l'andamento rispecchia chiaramente una variazione circadiana.

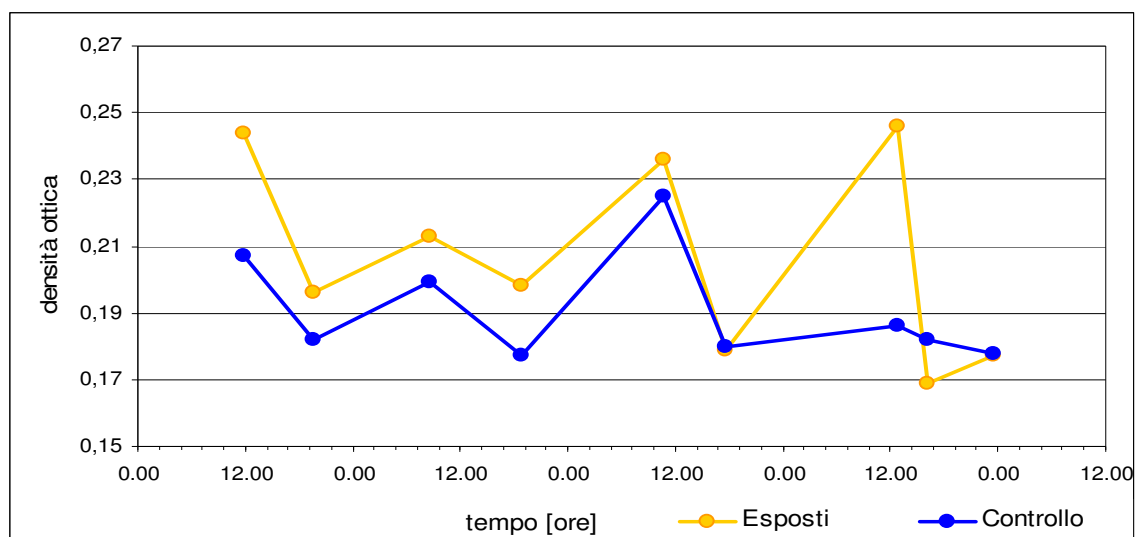


Fig. 2. Andamento dei valori di densità ottica dei campioni della coorte di controllo (in blu) e di quella esposta (in oro).

Inoltre i valori di densità ottica sono risultati maggiori durante la fotofase e minori in scotofase. Poiché i valori di concentrazione della melatonina sono inversamente proporzionali alle densità ottiche misurate, i risultati fanno presupporre che le concentrazioni dell'ormone, se fosse stato possibile calcolarli, sarebbero stati maggiori in scotofase rispetto alla fotofase. Questo andamento conferma *in vivo* per gli stadi prometamorfici quanto Green e collaboratori [Green et al., 1999] avevano dimostrato *in vitro* nell'epifisi e nella retina di *Xenopus* all'inizio della morfogenesi ed all'inizio della vita larvale. Infine, è di certo interessante notare che nonostante l'andamento delle misure di OD nel tempo sia analogo per le coorti di controllo e per quella esposta, le misure di OD di quest'ultima risultano maggiori (circa l'8% del valor medio) di quelle dei controlli per i medesimi campionamenti. Sebbene non sia stato possibile determinare con questo primo esperimento le concentrazioni di melatonina dei campioni, gli andamenti hanno suggerito che l'esposizione al campo magnetico dell'apparecchio televisivo potesse essere in grado di causare una riduzione del contenuto di questo ormone nella retina di *Xenopus*.

7.3 Grafici secondo esperimento

Anche in questo secondo esperimento, i valori delle densità ottiche degli standard misurati (in rosso) sono stati nel complesso inferiori a quelli attesi (Fig.3), sebbene di un fattore 2.5. Questa differenza è possibile che dipenda dalla differente lunghezza d'onda di assorbimento utilizzata nel rilevatore (450 nm) anziché i 405 nm consigliati per assorbire il PNPP. La correlazione tra i valori misurati e quelli attesi ha permesso di ricostruire l'andamento degli standard (in blu), in quanto le OD misurate erano comunque comprese all'interno dell'intervallo dei valori di OD attesi.

In Fig. 4 sono riportati gli andamenti delle densità ottiche dei campioni esposti (in oro) e di controllo (in blu). I valori rispecchiano l'andamento della Fig. 2 relativa ai risultati del primo esperimento, infatti anche questa volta si ha una variazione circadiana, le misure in fotofase sono maggiori di quelle in scotofase e i valori medi di OD dei campioni esposti superano di circa il 9% quelli dei rispettivi controlli.

In questo secondo esperimento è stato possibile tradurre i valori di densità ottiche in concentrazioni di melatonina, come raffigurato in Fig.6. In essa si confronta l'andamento nel tempo della concentrazione di melatonina in 20 retine di girini esposti al campo magnetico emesso dal televisore (in oro), e quello dei relativi campioni di controllo (in blu).

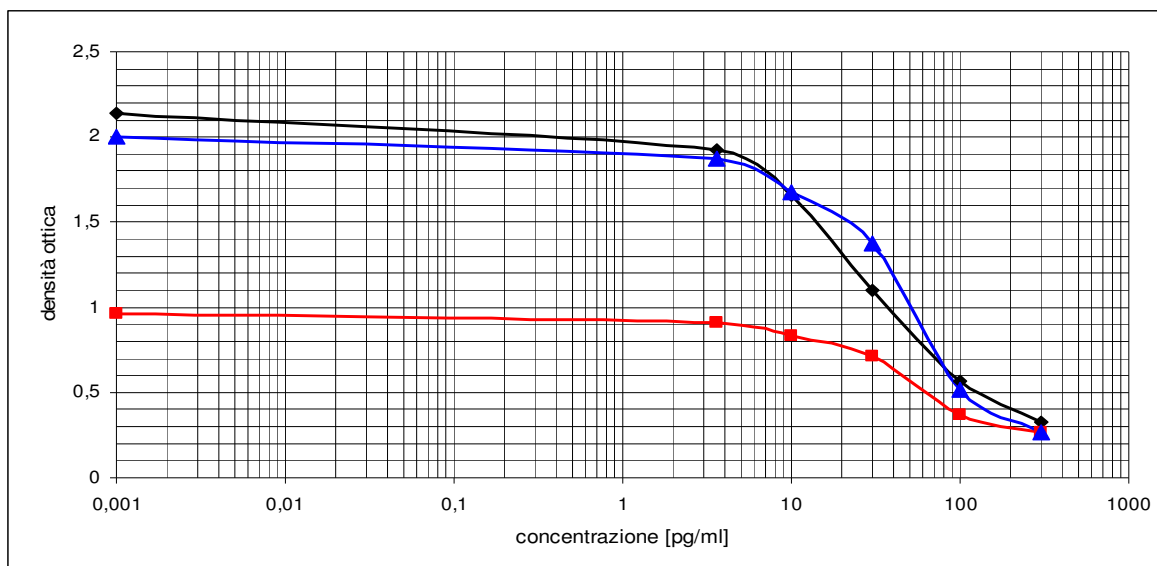
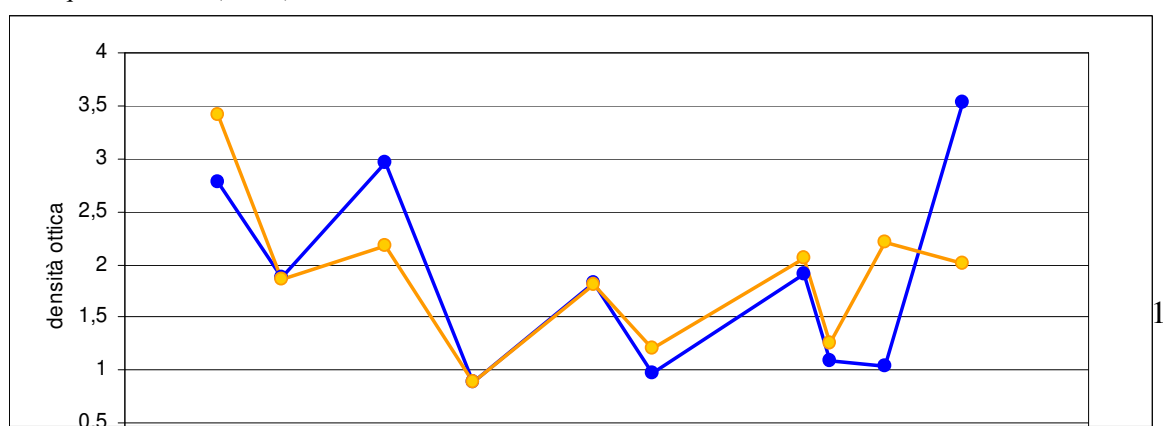


Fig. 3. Andamento dei valori di densità ottica degli standard attesi (in nero), di quelli misurati (in rosso) e di quelli ricavati (in blu).



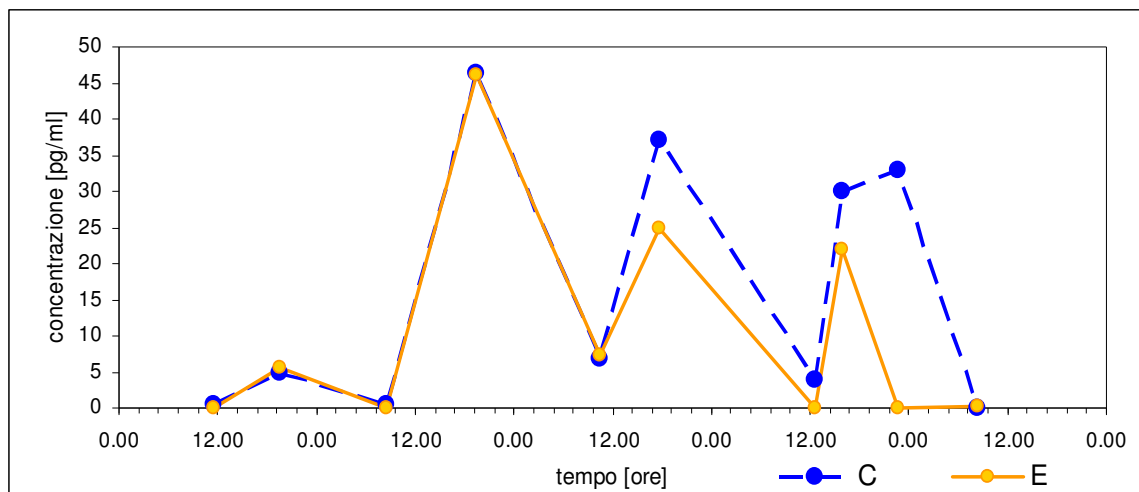


Fig. 5. Andamento nel tempo dei valori di concentrazione della melatonina dei campioni della corte di controllo (in blu) e di quella esposta (in oro).

Quanto fin qui ipotizzato sulla base delle densità ottiche misurate nel primo e secondo esperimento, viene ora confermato dai risultati delle concentrazioni. Infatti, come previsto l'andamento nel tempo della sintesi retinica di melatonina presenta un andamento circadiano anche negli stadi prometamorfici (55-56 [Nieuwkoop & Faber, 1956]) e non solo all'inizio della vita larvale come osservato da [Green et al., 1999]. Le concentrazioni di melatonina in fotofase sono minori di quelle in scotofase, a conferma dell'azione inibente della luce sulla sintesi di quest'ormone.

7.3.1 Analisi statistica dei dati di concentrazione

Il confronto tra le concentrazioni medie di melatonina retinica dei campioni esposti al campo magnetico emesso dall'apparecchio televisivo e quelle dei campioni di controllo è riportato in Tab. 1. In essa si osserva che il valore medio di concentrazione dei campioni (costituiti ciascuno da 20 retine di *Xenopus laevis*) ottenuti dai girini di controllo (trattamento 0) supera di 5.66 [pg/ml] quello dei girini esposti (trattamento 1). Per analizzare la significatività di questa differenza è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (Tab.2). Come si può osservare, l'analisi evidenzia che questa differenza tra controlli ed esposti non è significativa ($p > 0.05$), essendo oltretutto il valore 5.66 [pg/ml]

inferiore all'errore standard calcolato per i campioni di controllo (Tab.1). Da ciò risulta che nonostante dal grafico in Fig. 5, fosse possibile ipotizzare una riduzione della concentrazione di melatonina retinica nei girini a causa dell'esposizione al campo magnetico del televisore, tale riduzione non è statisticamente significativa.

	N	Concentrazione media [pg/ml]	SD	Errore Standard
trattamento 0	10	16.30	18.079	5.717
trattamento 1	10	10.64	15.560	4.921

Tab.1. Confronto tra le concentrazioni medie di melatonina dei campioni di controllo (trattamento 0) e di quelli esposti al campo magnetico (trattamento 1). N= numero di campioni; SD= deviazione standard.

	Somma dei quadrati	GdL	Media dei Quadrati	F	p
Tra i gruppi	160.178	1	160.178	.563	.463
Nei gruppi	5120.744	18	284.486		
Totale	5280.922	19			

Tab.2. Test ANOVA ad una via relativa alle concentrazioni di melatonina del secondo esperimento. GdL= gradi di libertà; F= valore critico della variabile di Fisher; p= probabilità di errare nel rigettare l'ipotesi nulla.

CONCLUSIONI

La ricerca che ho condotto durante i tre anni del Dottorato si è concentrata sugli effetti biologici dei campi magnetici a bassa frequenza e debole ampiezza. In particolare, l'idea iniziale e la procedura adottata, che si basano sul confronto tra il modello di sviluppo di coorti di girini di *Xenopus laevis* allevate in condizioni controllate ed in assenza di stress ed altre coorti allevate nelle medesime condizioni ma esposte ad un unico stress (il campo magnetico), prendono origine dal lavoro di Severini e collaboratori [2003] con alcune importanti novità.

Nel lavoro pubblicato nel 2003 da Severini, l'esposizione al campo magnetico emesso da un apparecchio televisivo (50 Hz; <20 μ T) aveva causato nei girini di *X. laevis* esposti un ritardo di sviluppo altamente significativo di 5 giorni, in assenza di malformazioni né mortalità. Nel presente lavoro di Tesi, è stato messo in evidenza ripetutamente che l'esposizione prolungata al campo magnetico a bassa frequenza e piccola ampiezza è in grado di determinare su girini della stessa specie, un ritardo della metamorfosi misurabile, non associato a malformazioni o a mortalità significativa. Il ritardo di sviluppo connesso all'esposizione ai campi elettromagnetici ELF è stato rilevato in differenti Classi di animali [Ubeda et al., 1983; Cameron et al., 1985; Zimmermann et

al., 1990; Zusman et al., 1990; Severini et al., 2003], sebbene la maggior parte delle ricerche *in vivo* si fossero concentrate sull'induzione di malformazioni in embrioni di pollo a seguito dell'esposizione a detti campi [Delgado et al. 1982, Ubeda et al. 1983, Juutilainen et al. 1986, Leal et al. 1989, Martin 1992, Koch et al. 1993, Farrel et al. 1997].

Tuttavia, mentre nel lavoro di Severini [2003] gli animali erano esposti a più armoniche emesse dal televisore, all'interno delle quali non è stato possibile determinare la (o le) combinazioni responsabili del ritardo. Nelle ricerche del mio Dottorato, essi erano esposti, all'interno di un solenoide opportunamente progettato e costruito, a due determinate combinazioni di frequenza ed intensità (50 Hz, 71.1 μ T rms; 50 Hz, 73.7 μ T rms). Inoltre, l'esposizione delle coorti è iniziata nello stadio embrionale, anziché larvale come in [Severini et al., 2003].

I tre esperimenti eseguiti durante il primo anno del Dottorato di Ricerca hanno evidenziato che anche una minima differenza nelle combinazioni di frequenza e ampiezza a cui sono stati esposti gli animali (Fig.3b, paragrafo 4.2) può determinare effetti significativamente differenti ($P<.05$) (Tab. 4, paragrafo 5.1.4). In particolare l'esposizione al campo magnetico d'intensità maggiore (73.7 μ T rms) ha prodotto un ritardo di sviluppo medio altamente significativo ($P<.001$) di 3,64 giorni rispetto i controlli, mentre quella al campo più debole (71.1 μ T rms) ha causato un ritardo non significativo (Tabb. 3 e 4, paragrafo 5.1.4) [Severini et al., in review]. Quanto osservato consente di definire una soglia d'effetto, per cui un campo magnetico di frequenza 50 Hz e ampiezza minore o uguale 100 μ T (pari ad un valore efficace di 71.1 μ T) non determina variazioni significative del tasso di sviluppo mentre un campo (sempre a 50 Hz) e di ampiezza 104 μ T (73.7 μ T rms) ritarda lo sviluppo in maniera altamente significativa.

Durante il secondo anno, ho analizzato l'effetto della frequenza di risonanza di ciclotrone sulla dinamica di sviluppo dei girini di *X. laevis*, in accordo con la teoria di Liboff [Liboff, 1985]. In questa serie di tre esperimenti sono state provate le medesime combinazioni di campo magnetico alternato dei precedenti (50 Hz, 71.1 μ T rms; 50 Hz, 73.7 μ T rms), aumentando in maniera opportuna il campo statico all'interno del solenoide per raggiungere la condizione di risonanza. I risultati, confermano il ruolo del campo magnetico a bassa frequenza sulla dinamica di sviluppo dell'animale, mostrando ancora una volta un ritardo significativo ($P<.05$) nel raggiungimento della metamorfosi. Tuttavia, il ritardo è risultato di minore entità (0,86 giorni) ed è stato possibile rilevarlo solo dopo aver unito i risultati delle coorti esposte $h=1,2$ e di controllo $h= 3,4$ tra loro, aumentando così il campione statistico (Tab. 9, paragrafo 5.2.4).

Infine per rivelare mediante quale meccanismo il campo magnetico a bassa frequenza e debole ampiezza determina una variazione del tasso di sviluppo dei girini di *Xenopus laevis*, ho deciso di indagare il ruolo della melatonina come ‘mediatore’ tra il campo magnetico ed il tasso di sviluppo. La melatonina infatti risulta essere un target biologico dei campi elettromagnetici a bassa frequenza [Reiter, 1998] da un lato, e agisce negli Anfibi come antagonista dell’ormone tiroideo contrastando lo sviluppo [Wright et al., 2000] dall’altro. Perciò, un aumento dei valori della melatonina plasmatica indotto dal campo magnetico può giustificare un rallentamento dello sviluppo. Da qui l’idea di verificare l’effetto del campo magnetico sul tasso di sviluppo e sulla concentrazione di melatonina in *Xenopus*. Tuttavia le difficoltà riscontrate nel prelevare la melatonina plasmatica nei girini di quest’Anuro, di dimensioni minori di quelli ad esempio di *Rana catesbeiana* modello biologico spesso utilizzato a tali scopi [Wright & Racine, 1997; Wright et al., 1999; Wright & Alves, 2001], mi hanno indotto ad effettuare l’analisi sulla melatonina contenuta nella retina. Quest’ultima, d’altro canto, in *Rana catesbeiana* segue comunque un andamento simile a quella plasmatica, riducendosi all’approssimarsi del climax metamorfico [Wright & Racine, 1997]. Per cui ho condotto due esperimenti in cui due coorti di 100 girini ciascuna sono state allevate nelle medesime condizioni, una delle quali esposta al campo magnetico di un apparecchio televisivo e l’altra mantenuta come controllo. In *Xenopus* era stato evidenziato un ritmo circadiano di sintesi della melatonina nell’epifisi e nella retina in stadi precoci dello sviluppo [Green et al., 1999], non era noto perciò il suo andamento in stadi prossimi alla metamorfosi. I risultati degli esperimenti del terzo anno hanno mostrato che i girini esposti presentavano un rallentamento significativo dello sviluppo ($p < .05$) rilevabile già tre settimane dopo l’ovideposizione (Tab. 1, paragrafo 7.1). Nonostante nel primo esperimento non sia stato possibile determinare le concentrazioni di melatonina retinica, i risultati riguardanti le densità ottiche dei campioni hanno evidenziato un andamento circadiano (Fig. 2, paragrafo 7.2), confermato dai risultati del secondo esperimento (Figg. 3 e 4, paragrafo 7.3). L’andamento ha evidenziato inoltre valori più elevati di melatonina durante la scotofase ed inferiori durante la fotofase, confermando il ruolo inibente della luce sulla sintesi di quest’ormone. Confrontando poi le concentrazioni di melatonina retinica dei campioni esposti e di quelli di controllo, la differenza media di 5.66 [pg/ml] evidenziata nel grafico di Fig.5 (paragrafo 7.3) è risultata non significativa (Tab.2, paragrafo 7.3.1). Il risultato potrebbe dipendere dal fatto che nella prometamorfosi avanzata i valori di melatonina retinica decrescono cosicché tendono a ridursi anche le possibili differenze di valori misurati in quegli stadi. Alla luce di questi

risultati non è possibile definire se la melatonina abbia un ruolo nel ritardo di sviluppo causato dal campo magnetico. Tuttavia, è stato ripetutamente confermato l'effetto del campo magnetico a bassa frequenza, il quale determina una riduzione del tasso di sviluppo dei girini di *Xenopus laevis*.

APPENDICE A

Frequenza di ciclotrone

Si consideri una particella puntiforme di carica q e massa m immersa in un campo magnetico costante nel tempo. Tale particella si muova con velocità $\vec{v}$ in un piano ortogonale alla direzione di $\vec{B}$.

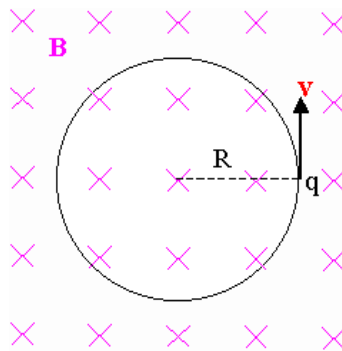


Fig.1 Moto della particella carica (ione).

Questa particella è sottoposta alla forza di Lorentz:

$$\vec{F} = q\vec{v} \times \vec{B}$$

Tale forza è ortogonale alla velocità, è del resto ortogonale anche al vettore induzione magnetica, se ne deduce quindi che il modulo della forza agente vale $F=qvB$ e non dipende dal tempo.

La particella sottoposta a questo tipo di forza si muove di moto circolare uniforme con accelerazione

$$a = \frac{v^2}{R}$$

Tale accelerazione è anche esprimibile come funzione della forza di Lorentz:

$$a = \frac{F}{m} = \frac{qvB}{m}$$

Per cui

$$\frac{v^2}{R} = \frac{qvB}{m}$$

Da questa ultima uguaglianza possiamo facilmente dedurre che il valore della pulsazione ω della particella che si muove nel campo magnetico statico $\vec{B}$ vale

$$\omega = \frac{v}{R} \qquad \omega = \frac{qB}{m}$$

La frequenza data da $\omega/2\pi$ è detta *frequenza di ciclotrone* e vale

$$f_c = \left(\frac{q}{2\pi m} \right) \cdot B$$

APPENDICE B

Modello teorico di Del Giudice e Preparata

L'Elettro Dinamica Quantistica (QED) è stata introdotta in particolare per studiare la natura dell'acqua e delle soluzioni acquose di elettroliti che sono, di fatto, i sistemi fisici utilizzati negli esperimenti di Zhadin [Zadhin et al., 1998]. Uno dei primi successi della QED è stato quello della scoperta dell'esistenza di fluttuazioni di un campo elettromagnetico anche nel vuoto dotate di una certa frequenza e lunghezza d'onda. Attraverso tali fluttuazioni è stato possibile costruire un nuovo modello che fosse rappresentativo dell'acqua [Preparata, 1995]. L'acqua liquida a temperatura ambiente, infatti, è costituita da due componenti con caratteristiche fisico-chimiche estremamente differenti. Una parte (circa il 40%) è in grado di risuonare con una frequenza del campo elettromagnetico fluttuante presente e di riemettere onde nell'infrarosso (IR). Di fatto ciò che accade è che le molecole d'acqua oscillano coerentemente (tutte insieme) tra due proprie configurazioni elettroniche, quella fondamentale ed una eccitata, la cui differenza energetica è $E=12\text{eV}$.

Esiste un numero critico N_{crit} di particelle per cui risulta che l'energia totale del sistema è nulla, in questo caso l'oscillazione risulta stabile e non vi è necessità di energia

aggiuntiva per mantenerla. Le molecole coinvolte in questa oscillazione comune “entrano” in una sfera di diametro pari alla lunghezza d’onda del campo fluttuante generatore di tale moto comune.

Sapendo che l’energia E è pari a 12eV ($E/hc=\tilde{\nu} = 96000\text{ cm}^{-1}$):

$$2R_{CD} = \lambda = \frac{1}{\tilde{\nu}} = \frac{1}{96000\text{ cm}^{-1}} \cong 1000 \cdot 10^{-8}\text{ cm} = 1000\text{ \AA}$$

La regione di spazio che contiene queste molecole oscillanti si chiama Dominio di Coerenza (CD) e può essere visualizzato come segue

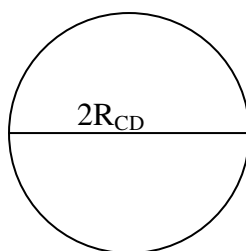


Fig 1. Proiezione su un piano del Dominio di Coerenza (CD) dell’acqua di diametro $2R_{CD}=1000\text{ \AA}$

La restante parte (il 60%), essendo la temperatura diversa da zero, è costituita da molecole, estratte dal CD a causa dell’agitazione termica, che formano una zona non coerente. Tali zone riempiono, per così dire, gli spazi tra un dominio di coerenza e l’altro così che un volume (una sua proiezione su un piano) d’acqua può essere rappresentato come in Fig.2.

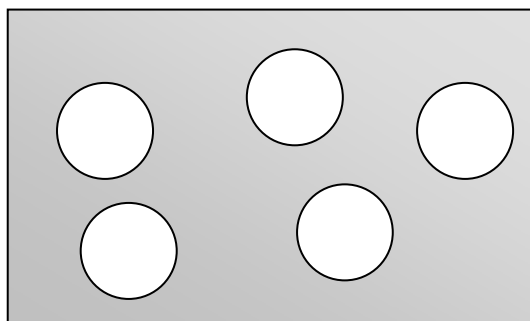


Fig 2. Proiezione su un piano dello spazio presente tra i CD.

Le due parti dell’acqua differiscono notevolmente specialmente per una grandezza fisica: la costante dielettrica. Nel CD la costante dielettrica ha un valore molto alto (160) e ciò è dovuto al fatto che le molecole oscillanti hanno un’alta polarizzabilità (polarizzazione per deformazione); le molecole della zona non coerente, al contrario, hanno un basso valore

della polarizzabilità (polarizzazione per orientamento) e quindi anche della costante dielettrica (16). Questo fa sì che un campo elettromagnetico esterno applicato sia sentito solo dalla frazione non coerente perché nel CD risulta pressoché schermato.

Se nell'acqua si aggiunge un elemento diverso da essa, uno ione ad esempio, questo si potrà posizionare solo nella zona non coerente. Avviene che una porzione di questi ioni nella zona non coerente si trovi alla frontiera con i CD (in questo spazio le caratteristiche fisico-chimiche sono praticamente come quelle dei CD) ed inizi ad oscillare con la frequenza IR del dominio di coerenza dell'acqua e ad esso rimanga legato. Questi ioni a loro volta sono, quindi, in grado di creare un nuovo dominio coerente intorno al CD dell'acqua (Fig.3).

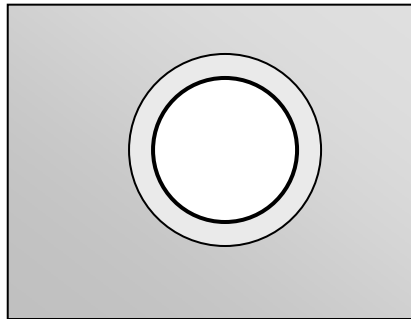


Fig.3. Nuovo CD in cui gli ioni oscillano con la frequenza IR del dominio di coerenza dell'acqua.

Il maggior effetto della formazione di un dominio coerente di ioni nella zona non coerente dell'acqua è quello per cui tali ioni, per mantenere la coerenza, non possono collidere tra loro. Questo importante modello costruito tramite la QED trova un'applicazione anche nella spiegazione dei fenomeni sperimentati da Zhadin [Zhadin et al.,1998; Del Giudice et al., 2002]. Non avvenendo collisioni se si applica un campo magnetico di bassa intensità il sistema coerente di ioni è in grado di sentirlo. Se il campo è statico (B_0) allora gli ioni, sotto l'azione della forza di Lorentz, iniziano a ruotare seguendo un'orbita ciclotronica di raggio pari a quello del CD dell'acqua (Fig.4).

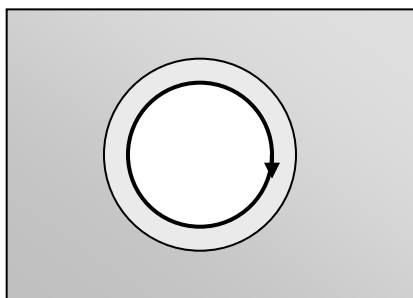


Fig.4. In presenza di B_0 gli ioni ruotano alla frequenza di risonanza ciclotronica f_c .

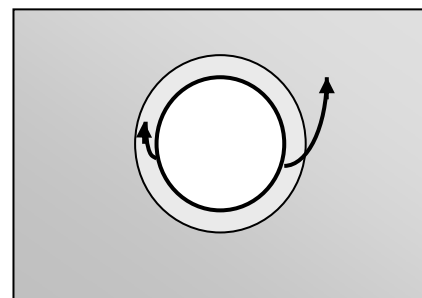


Fig.5. In presenza di B_0 più B_{AC} gli ioni possono fuoriuscire dall'orbita ciclotronica.

Se ora al campo B_0 si aggiunge anche un campo alternato B_{AC} , quello che sostanzialmente avviene è che gli ioni possono muoversi non solo con la frequenza fondamentale ma anche con le altre frequenze di risonanza proprie dello ione. E' possibile che gli ioni rimangano all'interno del dominio di coerenza o ne escano fuori e questo dipende dalla velocità iniziale posseduta dagli ioni e, quindi, dall'intensità del campo magnetico alternato applicato. Se la velocità degli ioni è sufficientemente bassa questi rimangono nel CD di ioni e si allineano con il campo presente altrimenti entrano nel dominio di non coerenza dove sono sottoposti all'agitazione termica (Fig.5).

APPENDICE C

Matrici Stadio Frequenza esperimenti serie I

deposizione $i=1$ coorte $h=1$														deposizione $i=1$ coorte $h=2$														
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,1}(j)$	λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,2}(j)$	
3	35													3	35													
11		2	7	21	5								49,83	11		2	2	22	9								50,09	
12			1	20	14								50,37	12		2		15	18								50,4	
13				9	26								50,74	13			2	4	29								50,77	
14				1	24	10							51,26	14				2	23	10							51,23	
15					13	17	5						51,77	15					7	21	7						52	
16					3	14	17	1					52,46	16					2	13	20						52,51	
17						9	20	6					52,91	17						4	23	8					53,11	
18						1	12	22					53,6	18							8	27					53,77	
19							7	23	5				53,94	19						1	23	11					54,29	
20								2	18	15			54,37	20							1	15	19				54,51	
21									10	16	9		54,97	21							1	6	22	6			54,94	
22								3	17	15			55,34	22							3	14	18				55,43	
23									12	23			55,66	23								1	8	26			55,71	
24									8	24	3		55,86	24									4	26	5		56,03	
25										28	7		56,2	25									1	27	7		56,17	
26											24	11	56,31	26									1	24	10		56,26	
27											19	16	56,46	27										22	13		56,37	
28											18	17	56,49	28										17	17	1	56,54	
29											12	19	4	56,77	29									10	21	4	56,83	
30											10	20	5	56,86	30										6	21	8	57,06
31											7	18	10	57,09	31										4	21	10	57,17
32											5	13	17	57,34	32										4	15	16	57,34
33											2	13	20	57,51	33										4	14	17	57,37
34											2	11	22	57,57	34										3	10	22	57,54
35											1	11	23	57,63	35										2	7	26	57,69
36											1	10	24	57,66	36										2	4	29	57,77
37											1	9	25	57,69	37										2	4	29	57,77
38											1	8	26	57,71	38										2	3	30	57,91
39												7	28	57,8	39										1	3	31	57,86
40												7	28	57,8	40											4	31	57,89
41												6	29	57,83	41											4	31	57,89
42												6	29	57,83	42											4	31	57,89

deposizione $i=1$ coorte $h=3$																
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,3}(j)$			
3	35															
11			1	25	9								50,23			
12				10	25								50,71			
13				2	33								50,94			
14					19	16							51,46			
15					4	17	14						52,29			
16						5	29	1					52,89			
17						1	18	16					53,43			
18							4	31					53,89			
19								17	17				54,5			
20								7	26	1			54,82			
21								4	17	13			55,26			
22								1	6	27			55,76			
23									3	30	1		55,94			
24									1	22	11		56,29			
25										19	15		56,44			
26										17	17		56,5			
27										9	25		56,74			
28										9	24	1	56,76			
29										4	25	5	57,03			
30										4	20	10	57,18			
31										3	15	16	57,38			
32										3	8	23	57,59			
33										9	25		57,74			
34										7	27		57,79			
35										6	28		57,82			
36										4	30		57,88			
37										3	31		57,91			
38										3	31		57,91			
39										2	32		57,94			
40										2	32		57,94			
41										2	32		57,94			
42										2	32		57,94			
43										2	32		57,94			
44										1	33		57,97			
45										1	33		57,97			
46										1	33		57,97			
47										1	33		57,97			
48										1	33		57,97			
49										1	33		57,97			
50										1	33		57,97			
51											34		58			
52																
53																
54																
55																
56																
57																
58																
59																
60																
61																
62																

Tabella 3. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{1,3}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=3$ della deposizione $i=1$.

deposizione $i=1$ coorte $h=4$														
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,4}(j)$	
3	35													
11				19	16								50,46	
12				4	31								50,89	
13					27	8							51,23	
14					13	21	1						51,66	
15					1	12	21	1					52,63	
16						2	26	7					53,14	
17							10	25					53,71	
18							2	27	6				54,11	
19								14	21				54,6	
20								5	23	7			55,06	
21								2	15	18			55,46	
22									5	30			55,86	
23									1	26	8		56,2	
24										19	16		56,46	
25										19	16		56,46	
26										14	21		56,6	
27										10	25		56,71	
28										7	24	4	56,91	
29										4	23	8	57,11	
30										2	21	12	57,29	
31										2	17	16	57,4	
32											14	21	57,6	
33											9	26	57,74	
34											5	30	57,86	
35											4	31	57,89	
36											3	32	57,91	
37											2	33	57,94	
38											2	33	57,94	
39											2	33	57,94	
40											2	33	57,94	
41											2	33	57,94	
42											1	34	57,97	
43											1	34	57,97	
44											1	34	57,97	
45											1	34	57,97	
46											1	34	57,97	
47												35	58	
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														

Tabella 4. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{1,4}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=4$ della deposizione $i=1$.

deposizione $i=2$ coorte $h=1$																
$j \backslash k$	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{2,1}(j)$			
3	35															
11			1	13	21								50,57			
12				3	31	1							50,94			
13					18	17							51,49			
14					3	23	9						52,17			
15					2	11	21	1					52,6			
16						3	22	10					53,2			
17						2	14	19					53,49			
18							8	22	5				53,91			
19							4	16	15				54,31			
20						2	7	23	3				54,77			
21							3	19	13				55,29			
22							2	7	26				55,69			
23							1	3	29	2			55,91			
24								1	2	23	9		56,14			
25								3	17	15			56,34			
26									10	24	1		56,74			
27								8	24	2			56,82			
28								6	24	5			56,97			
29								5	20	10			57,14			
30								3	17	15			57,34			
31								2	8	25			57,66			
32								2	7	26			57,69			
33								1	5	29			57,8			
34								4	31				57,89			
35								3	32				57,91			
36								3	32				57,91			
37								3	32				57,91			
38									2	33			57,94			
39									2	33			57,94			
40										35		58				
41																
42																
43																
44																
45																
46																
47																
48																
49																
50																
51																
52																
53																
54																
55																
56																
57																
58																
59																
60																
61																
62																

Tabella 5. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{2,1}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=1$ della deposizione $i=2$.

deposizione $i=2$ coorte $h=2$																
$j \backslash k$	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{2,2}(j)$			
3	35															
11					17	18							50,51			
12					5	28	2						50,91			
13					3	17	15						51,34			
14						6	22	7					52,03			
15						4	10	19	2				52,54			
16						2	4	20	9				53,03			
17						1	3	16	15				53,29			
18						1	1	7	21	5			53,8			
19							1	4	18	12			54,17			
20							1	2	10	18	4		54,63			
21								2	2	17	14		55,23			
22								1	2	9	23		55,54			
23								1	2	2	26	4	55,86			
24									3	2	20	10	56,06			
25									2	1	15	17	56,34			
26									1	2	11	21	56,49			
27									1	1	9	24	56,6			
28									1		10	24	56,63			
29									1		6	26	56,8			
30									1		4	17	57,17			
31									1		4	13	57,29			
32									1		2	11	57,46			
33									1		2	7	57,57			
34									1		2	3	57,69			
35									1		1	3	57,74			
36									1		1	3	57,74			
37									1			4	57,77			
38									1			4	57,77			
39									1			3	57,8			
40									1			2	57,83			
41									1			2	57,83			
42									1			1	57,86			
43									1			1	57,86			
44										1			57,91			
45										1			57,91			
46										1			57,91			
47										1			57,91			
48										1			57,91			
49										1			57,91			
50											1		57,94			
51											1		57,94			
52												1	57,97			
53												1	57,97			
54													58			
55																
56																
57																
58																
59																
60																
61																
62																

Tabella 6. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{2,2}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=2$ della deposizione $i=2$.

deposizione $i=2$ coorte $h=3$														$K_{2,3}(j)$
j_k	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58		
3	35													
11					8	27								50,77
12					30	5								51,14
13					7	28								51,8
14						19	16							52,46
15					5	27	3							52,94
16						19	16							53,46
17						13	21	1						53,66
18						1	20	14						54,37
19							10	24	1					54,74
20							3	24	8					55,14
21								11	24					55,69
22								1	32	2				56,03
23									26	9				56,26
24									17	18				56,51
25									12	23				56,66
26									8	27				56,77
27									6	28	1			56,86
28									3	29	3			57
29									1	26	8			57,2
30										20	15			57,43
31										12	23			57,66
32										12	23			57,66
33										6	29			57,83
34										6	29			57,83
35										3	32			57,91
36										2	33			57,94
37										2	33			57,94
38										1	34			57,97
39											35			58
40														
41														
42														
43														
44														
45														
46														
47														
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														

Tabella 7. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{2,3}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=3$ della deposizione $i=2$.

deposizione $i=2$ coorte $h=4$														$K_{2,4}(j)$
j_k	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58		
3	35													
11					1	34								50,97
12					18	17								51,49
13					1	30	4							52,09
14						13	21	1						52,66
15							29	6						53,17
16							16	19						53,54
17							7	25	3					53,89
18								18	16	1				54,51
19								4	25	6				55,06
20									19	16				55,46
21									7	28				55,8
22										29	6			56,17
23										21	14			56,4
24										14	21			56,6
25										11	24			56,69
26										3	31	1		56,94
27										2	25	8		57,17
28										1	22	12		57,31
29											18	17		57,49
30											14	21		57,6
31											11	24		57,69
32											8	27		57,77
33											4	31		57,89
34											4	31		57,89
35											3	32		57,91
36											1	34		57,97
37												35		58
38														
39														
40														
41														
42														
43														
44														
45														
46														
47														
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														

Tabella 8. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{2,4}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=4$ della deposizione $i=2$.

deposizione $i=3$ coorte $h=1$															
$j \backslash k$	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,1}(j)$		
3	35														
11			2	7	26								50,69		
12			1	2	25	7							51,09		
13			1	1	13	19	1						51,51		
14			2	4	17	12							52,11		
15			2	1	14	17	1						52,4		
16			2		4	15	14						53,11		
17				2	2	9	20	2					53,51		
18				2		5	14	14					54,09		
19			1	1	1	13	17	2					54,43		
20			1		1	11	17	5					54,66		
21			1		1	3	15	15					55,17		
22			1			1	13	20					55,43		
23			1			1	8	25					55,57		
24			1				5	27	2				55,77		
25			1				1	25	8				56,06		
26			1				1	21	12				56,17		
27			1				1	14	18	1			56,4		
28			1					12	18	4			56,6		
29			1					8	21	5			56,74		
30			1					6	20	8			56,89		
31			1					5	17	12			57,03		
32			1					4	14	16			57,17		
33			1					3	14	17			57,23		
34			1					3	12	19			57,29		
35			1					1	14	19			57,34		
36			1					1	10	23			57,46		
37			1					1	8	25			57,51		
38			1					1	8	25			57,51		
39			1					1	7	26			57,54		
40			1						6	28			57,63		
41				1					5	29			57,69		
42				1					5	29			57,69		
43				1					5	29			57,69		
44					1				5	29			57,71		
45					1				4	30			57,74		
46					1				2	32			57,8		
47					1				2	32			57,8		
48						1			1	33			57,86		
49						1			1	33			57,86		
50							1			34			57,89		
51								1		34			57,91		
52								1		34			57,91		
53								1		34			57,91		
54									1	34			57,94		
55									1	34			57,94		
56										35	58				
57															
58															
59															
60															
61															
62															

Tabella 9. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{3,1}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=1$ della deposizione $i=3$.

deposizione $i=3$ coorte $h=2$															
$j \backslash k$	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,2}(j)$		
3	35														
11		3	5	9	18								50,2		
12		2	3	3	21	6							50,74		
13			2	3	17	11	1						51,18		
14			1	1	12	13	7						51,71		
15				1	8	8	17						52,21		
16				1	6	7	15	5					52,5		
17					6	6	10	12					52,82		
18					3	6	7	16	2				53,24		
19					2	5	6	11	10				53,65		
20					1	2	7	9	11	3			54,09		
21					1	1	5	9	10	7			54,42		
22					1		3	10	5	14			54,82		
23					1		3	8	5	16			54,94		
24						1	3	5	6	17	1		55,15		
25						1		3	8	17	4		55,58		
26							1	2	6	17	7		55,82		
27							1	1	4	15	12		56,09		
28							1		3	16	13		56,21		
29							1		2	14	15	1	56,36		
30								1	2	13	15	2	56,42		
31								1		14	14	4	56,58		
32								1		8	16	8	56,88		
33								1		8	14	10	56,94		
34							1			7	14	11	57		
35								1		7	14	11	57,03		
36									1	7	10	15	57,15		
37									1	7	9	16	57,18		
38									1	7	9	16	57,18		
39									1	6	9	17	57,24		
40									1	5	9	18	57,3		
41									1	5	9	18	57,3		
42									1	4	9	19	57,36		
43									1	4	8	20	57,39		
44									1	4	8	20	57,39		
45									1	4	8	20	57,39		
46										1	4	7	21	57,45	
47										1	4	7	21	57,45	
48										1	3	7	22	57,52	
49										1	3	7	22	57,52	
50											4	5	24	57,61	
51											4	5	24	57,61	
52											4	4	25	57,64	
53											3	4	26	57,7	
54											3	3	27	57,73	
55											3	3	27	57,73	
56											2	3	28	57,79	
57											2	2	29	57,82	
58											1	3	29	57,85	
59												4	29	57,88	
60												3	30	57,91	
61												2	31	57,94	
62													32	58	

Tabella 10. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{3,2}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=2$ della deposizione $i=3$.

deposizione $i=3$ coorte $h=3$																
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,3}(j)$			
3	35															
11			1	2	29	3							50,97			
12				2	17	16							51,4			
13				1	7	18	9						52			
14					5	10	20						52,43			
15					1	7	21	6					52,91			
16					1	3	13	16	2				53,43			
17						3	3	19	10				54,03			
18						1	2	12	20				54,46			
19						1	2	6	19	7			54,83			
20							1	5	18	11			55,11			
21							1	3	9	22			55,49			
22								2	8	25			55,66			
23								2	3	26	4		55,91			
24								2	3	24	6		55,97			
25								1	3	17	14		56,26			
26									4	13	18		56,4			
27									3	8	23	1	56,63			
28									2	6	23	4	56,83			
29									1	6	21	7	56,97			
30										6	20	9	57,09			
31										6	17	12	57,17			
32										6	13	16	57,29			
33										4	11	20	57,46			
34										4	11	20	57,46			
35										3	11	21	57,51			
36										3	9	23	57,57			
37										3	6	26	57,66			
38										3	4	28	57,71			
39										3	4	28	57,71			
40										3	4	28	57,71			
41										3	4	28	57,71			
42										3	4	28	57,71			
43										3	3	29	57,74			
44										3	3	29	57,74			
45										3	3	29	57,74			
46										2	3	30	57,8			
47										2	2	31	57,83			
48										2	2	31	57,83			
49										1	3	31	57,86			
50										1	3	31	57,86			
51										1	1	33	57,91			
52										1	1	33	57,91			
53										1	1	33	57,91			
54										1	1	33	57,91			
55										1	1	33	57,91			
56											1	34	57,97			
57											1	34	57,97			
58												35	58			
59																
60																
61																
62																

Tabella 11. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{3,3}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=3$ della deposizione $i=3$.

deposizione $i=3$ coorte $h=4$																
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,4}(j)$			
3	35															
11				1	2	30	2						50,94			
12					1	17	17						51,46			
13						9	15	11					52,06			
14						5	8	21	1				52,51			
15						3	3	20	9				53			
16							5	8	19	3			53,57			
17							4	4	19	8			53,89			
18							3	3	7	21	1		54,4			
19							1	5	5	14	10		54,77			
20								4	4	14	13		55,03			
21								3	4	8	20		55,29			
22								1	3	7	23	1	55,57			
23								1	3	3	26	2	55,71			
24									3	3	22	7	55,94			
25									2	2	18	13	56,2			
26									2	2	13	18	56,34			
27									2	1	10	22	56,49			
28									1	1	9	21	3	56,69		
29									1	1	8	17	8	56,86		
30										2	5	18	10	57,03		
31										2	4	17	12	57,11		
32										2	4	11	18	57,29		
33										1	5	7	22	57,43		
34									1	4	7	23	57,49			
35										5	7	23	57,51			
36										5	7	23	57,51			
37										4	6	25	57,6			
38										4	6	25	57,6			
39										4	5	26	57,63			
40										4	4	27	57,66			
41										4	3	28	57,69			
42										4	2	29	57,71			
43										4	2	29	57,71			
44										3	2	30	57,77			
45										2	1	32	57,86			
46										1	2	32	57,89			
47										1	2	32	57,89			
48										1	1	33	57,91			
49										1	1	33	57,91			
50										1	1	33	57,91			
51											2	33	57,94			
52											2	33	57,94			
53											1	34	57,97			
54											1	34	57,97			
55												35	58			
56																
57																
58																
59																
60																
61																
62																

Tabella 12. Serie I. MSF e stadio medio pesato $K_{3,4}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=4$ della deposizione $i=3$.

Matrici Stadio Frequenza esperimenti serie II

deposizione $i=1$ coorte $h=1$														
$j \backslash k$	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,1}(j)$	
3	34													
11					1	33							50,97	
12						34							51	
13						23	11						51,32	
14						7	27						51,79	
15						1	27	6					52,15	
16							13	20	1				52,65	
17							4	25	5				53,03	
18							1	16	17				53,47	
19								8	25	1			53,79	
20								4	26	4			54	
21								2	23	9			54,21	
22									18	13	3		54,56	
23									6	18	10		55,12	
24									3	12	19		55,47	
25									1	10	23		55,65	
26									1	5	25	3	55,88	
27									1	2	26	5	56,03	
28										2	23	8	1	56,24
29										2	17	13	2	56,44
30										2	15	14	3	56,53
31										1	12	15	6	56,76
32										1	11	12	10	56,91
33										1	10	10	13	57,03
34										1	6	12	15	57,21
35										1	3	12	18	57,38
36										1	2	11	20	57,47
37										1	2	9	22	57,53
38										1	2	7	24	57,59
39										1	1	6	26	57,68
40										1	1	4	28	57,74
41										1	0	4	29	57,79
42										1	0	4	29	57,79
43										1	0	3	30	57,82
44										1	0	3	30	57,82
45										1	0	3	30	57,82
46										1	0	3	30	57,82
47										1	0	2	31	57,85
48										1	0	2	31	57,85
49										1	0	2	31	57,85
50										1	0	2	31	57,85
51										1	0	2	31	57,85
52										1	0	2	31	57,85
53										1	0	2	31	57,85
54										1	0	1	32	57,88
55										1	0	1	32	57,88
56										1	0	1	32	57,88
57										1	0	1	32	57,88
58										1	0	1	32	57,88
59										1	0	1	32	57,88
60										1	0	1	32	57,88
61										1	0	1	32	57,88
62										1	0	1	32	57,88

Tabella 13. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{1,1}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=1$, deposizione $i=1$.

deposizione $i=1$ coorte $h=2$														
$j \backslash k$	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,2}(j)$	
3	34													
11					1	33							50,97	
12						33	1						51,03	
13						22	12						51,35	
14						2	32						51,94	
15							26	8					52,24	
16							11	22	1				52,71	
17							3	24	7				53,12	
18								16	18				53,53	
19								8	25	1			53,79	
20								2	29	3			54,03	
21									26	8			54,24	
22									17	14	3		54,59	
23									6	18	10		55,12	
24									2	14	18		55,47	
25									2	10	22		55,59	
26										6	26	2	55,88	
27										3	27	4	56,03	
28										2	24	7	56,21	
29										2	19	12	56,35	
30										1	19	10	56,5	
31											15	14	56,71	
32											13	12	56,88	
33											11	11	57,03	
34											9	10	57,18	
35											4	15	57,32	
36											4	13	57,38	
37											4	10	57,47	
38											4	8	57,53	
39											4	4	57,65	
40											4	3	57,68	
41											3	3	57,74	
42											3	3	57,74	
43											2	3	57,79	
44											2	3	57,79	
45											2	3	57,79	
46											1	4	57,82	
47											1	3	57,85	
48											1	2	57,88	
49											1	2	57,88	
50											1	2	57,88	
51											1	2	57,88	
52											1	2	57,88	
53											1	2	57,88	
54											1	2	57,88	
55											1	2	57,88	
56											1	2	57,88	
57											1	1	57,91	
58											1	1	57,91	
59											1	1	57,91	
60											1	1	57,91	
61											1	1	57,91	
62											1	0	57,94	

Tabella 14. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{1,2}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=2$, deposizione $i=1$.

deposizione $i=1$ coorte $h=3$													
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,3}(j)$
3	34												
11					1	33							50,97
12						33	1						51,03
13						16	18						51,53
14					1	33							51,97
15						19	15						52,44
16						5	28	1					52,88
17						2	23	9					53,21
18							10	24					53,71
19							5	26	3				53,94
20							2	26	6				54,12
21								20	13	1			54,44
22								10	20	4			54,82
23								3	16	15			55,35
24								1	9	24			55,68
25									5	28	1		55,88
26									2	27	5		56,09
27									2	22	10		56,24
28									2	16	15	1	56,44
29									2	8	23	1	56,68
30									2	6	23	3	56,79
31									2	4	24	4	56,88
32									1	2	21	8	57,13
33									1	2	17	14	57,29
34									1	2	14	17	57,38
35									1	2	10	21	57,5
36										3	6	25	57,65
37										3	3	28	57,74
38										2	4	28	57,76
39										2	3	29	57,79
40										2	3	29	57,79
41										2	2	30	57,82
42										2	2	30	57,82
43										2	1	31	57,85
44										2	1	31	57,85
45										2	1	31	57,85
46										2	1	31	57,85
47										2	1	31	57,85
48										2	0	32	57,88
49										2	0	32	57,88
50										2	0	32	57,88
51										2	0	32	57,88
52										2	0	32	57,88
53										2	0	32	57,88
54										2	0	32	57,88
55										2	0	32	57,88
56										2	0	32	57,88
57										2	0	32	57,88
58										2	0	32	57,88
59										2	0	32	57,88
60										2	0	32	57,88
61										2	0	32	57,88
62										2	0	32	57,88

Tabella 15. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{1,3}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=3$, deposizione $i=1$.

deposizione $i=1$ coorte $h=4$													
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{1,4}(j)$
3	34												
11					34								51
12					32	2							51,06
13					15	19							51,56
14					2	32							51,94
15						19	15						52,44
16						6	26	2					52,88
17						3	22	9					53,18
18							10	24					53,71
19							5	27	2				53,91
20							1	28	5				54,12
21								21	11	1			54,39
22								11	20	3			54,76
23								3	15	16			55,38
24									11	23			55,68
25									6	26	2		55,88
26									2	28	4		56,06
27									2	23	9		56,21
28									1	19	13	1	56,41
29									1	12	19	2	56,65
30									1	10	20	3	56,74
31									1	7	21	5	56,88
32										5	19	10	57,15
33										4	19	11	57,21
34										3	17	14	57,32
35										2	13	19	57,5
36										2	10	22	57,59
37										2	8	24	57,65
38										2	7	25	57,68
39										2	4	28	57,76
40										2	4	28	57,76
41										2	3	29	57,79
42										1	2	31	57,88
43										1	2	31	57,88
44										1	1	32	57,91
45										1	1	32	57,91
46										1	1	32	57,91
47										1	1	32	57,91
48										1	1	32	57,91
49										1	0	33	57,94
50										1	0	33	57,94
51										1	0	33	57,94
52										1	0	33	57,94
53										1	0	33	57,94
54										1	0	33	57,94
55										1	0	33	57,94
56										1	0	33	57,94
57										1	0	33	57,94
58										1	0	33	57,94
59										1	0	33	57,94
60										1	0	33	57,94
61										1	0	33	57,94
62										1	0	33	57,94

Tabella 16. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{1,4}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=4$, deposizione $i=1$.

deposizione $i=2$ coorte $h=1$														
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{2,1}(j)$	
3	34													
11					1	33							50,97	
12						33	1						51,03	
13						21	13						51,38	
14						6	26	2					51,88	
15						22	12						52,35	
16						5	28	1					52,88	
17						2	24	8					53,18	
18							14	20					53,59	
19							3	30	1				53,94	
20								25	9				54,26	
21								13	20	1			54,65	
22								9	18	7			54,94	
23								1	22	11			55,29	
24									13	21			55,62	
25									6	26	2		55,88	
26									3	27	4		56,03	
27									1	27	7		56,17	
28										20	13	1	56,44	
29										11	22	1	56,71	
30										8	23	3	56,85	
31										6	21	7	57,03	
32										4	20	10	57,18	
33										3	16	15	57,35	
34										3	10	21	57,53	
35										2	8	24	57,65	
36										1	5	27	57,79	
37											5	29	57,85	
38											3	31	57,91	
39											1	33	57,97	
40											1	33	57,97	
41											1	33	57,97	
42												34	58	
43														
44														
45														
46														
47														
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														

Tabella 17. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{2,1}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=1$, deposizione $i=2$.

deposizione $i=2$ coorte $h=2$														
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{2,2}(j)$	
3	34													
11						34							51	
12						32	2						51,06	
13						21	13						51,38	
14						5	27	2					51,91	
15							23	11					52,32	
16							6	26	2				52,88	
17							2	23	9				53,21	
18								13	21				53,62	
19								4	27	3			53,97	
20								1	23	10			54,26	
21									14	17	3		54,68	
22									8	18	8		55	
23									1	20	13		55,35	
24										11	22	1	55,71	
25										5	26	3	55,94	
26										2	27	5	56,09	
27										1	23	9	56,29	
28										1	17	14	56,5	
29										1	10	21	56,74	
30										1	7	20	56,91	
31										1	6	19	57	
32											5	16	57,24	
33											4	13	57,38	
34											4	9	57,5	
35											3	8	57,59	
36											2	6	57,71	
37											1	6	57,76	
38												6	57,82	
39												5	57,85	
40												3	57,91	
41												3	57,91	
42												2	57,94	
43												2	57,94	
44												1	57,97	
45												1	57,97	
46												1	57,97	
47													58	
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														

Tabella 18. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{2,2}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=2$, deposizione $i=2$.

deposizione $i=2$ coorte $h=3$															
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{2,3}(j)$		
3	34														
11					34								51		
12					32	2							51,06		
13					19	15							51,44		
14					4	27	3						51,97		
15					21	13							52,38		
16					4	27	3						52,97		
17					1	21	12						53,32		
18						12	22						53,65		
19						2	28	4					54,06		
20						23	11						54,32		
21						12	20	2					54,71		
22						5	22	7					55,06		
23							19	15					55,44		
24							10	22	2				55,76		
25							2	28	4				56,06		
26							1	27	6				56,15		
27							1	22	11				56,29		
28							15	17	2				56,62		
29							9	21	4				56,85		
30							6	23	5				56,97		
31							4	21	9				57,15		
32							3	16	15				57,35		
33							2	13	19				57,5		
34							1	9	24				57,68		
35							8	26					57,76		
36							6	28					57,82		
37							4	30					57,88		
38							3	31					57,91		
39							2	32					57,94		
40							1	33					57,97		
41							1	33					57,97		
42							1	33					57,97		
43							1	33					57,97		
44								34					58		
45															
46															
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
55															
56															
57															
58															
59															
60															
61															
62															

Tabella 19. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{2,3}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=3$, deposizione $i=2$.

deposizione $i=2$ coorte $h=4$															
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{2,4}(j)$		
3	34														
11					34								51		
12					32	2							51,06		
13					17	17							51,5		
14					3	28	3						52		
15					18	16							52,47		
16					2	28	4						53,06		
17						21	13						53,38		
18						11	23						53,68		
19						1	28	5					54,12		
20						22	12						54,35		
21						10	21	3					54,79		
22						3	21	8					55,16		
23						1	17	16					55,44		
24							8	24	2				55,82		
25							2	28	4				56,06		
26							1	26	7				56,18		
27							22	12					56,35		
28								15	17	2			56,62		
29								10	21	3			56,79		
30								6	21	7			57,03		
31								3	21	10			57,21		
32								1	18	15			57,41		
33								1	15	18			57,5		
34								1	11	22			57,62		
35									11	23			57,68		
36									6	28			57,82		
37									2	32			57,94		
38									1	33			57,97		
39									1	33			57,97		
40									1	33			57,97		
41									1	33			57,97		
42									1	33			57,97		
43									1	33			57,97		
44									1	33			57,97		
45									1	33			57,97		
46										34			58		
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
55															
56															
57															
58															
59															
60															
61															
62															

Tabella 20. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{2,4}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=4$, deposizione $i=2$.

deposizione $i=3$ coorte $h=1$														
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,1}(j)$	
3	34													
11				4	30								50,88	
12					30	4							51,12	
13					15	19							51,56	
14					6	25	3						51,91	
15						17	17						52,5	
16						6	24	4					52,94	
17						2	19	13					53,32	
18							16	18					53,53	
19							8	24	2				53,82	
20							2	22	10				54,24	
21							1	18	13	2			54,47	
22								10	16	8			54,94	
23								5	14	15			55,29	
24								2	12	20			55,53	
25									11	22	1		55,71	
26									7	20	7		56	
27									4	21	9		56,15	
28									2	20	11	1	56,32	
29									1	17	13	3	56,53	
30									1	12	15	6	56,76	
31									1	11	14	8	56,85	
32										7	17	10	57,09	
33										4	18	12	57,24	
34										3	15	16	57,38	
35										2	14	18	57,47	
36										1	12	21	57,59	
37										1	9	24	57,68	
38											7	27	57,79	
39											5	29	57,85	
40											4	30	57,88	
41											3	31	57,91	
42											2	32	57,94	
43											1	33	57,97	
44											1	33	57,97	
45												34	58	
46														
47														
48														
49														
50														
51														
52														
53														
54														
55														
56														
57														
58														
59														
60														
61														
62														

Tabella 21. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{3,1}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=1$, deposizione $i=3$.

deposizione $i=3$ coorte $h=2$													
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,2}(j)$
3	34												
11					3	31							50,91
12						29	5						51,15
13						13	20	1					51,65
14						1	28	5					52,12
15							17	16	1				52,53
16							4	25	5				53,03
17							1	19	14				53,38
18								15	19				53,56
19								9	24	1			53,76
20								2	21	11			54,26
21								1	17	14	2		54,5
22									11	15	8		54,91
23									4	17	13		55,26
24									1	15	18		55,5
25										12	22		55,65
26										8	21	5	55,91
27										4	23	7	56,09
28										3	21	10	56,21
29										2	16	14	2 56,47
30										1	13	17	3 56,65
31										1	12	15	6 56,76
32										1	10	12	11 56,97
33											8	13	13 57,15
34											5	14	15 57,29
35											4	13	17 57,38
36											3	12	19 57,47
37											2	11	21 57,56
38											1	10	23 57,65
39												8	26 57,76
40												6	28 57,82
41												5	29 57,85
42												3	31 57,91
43												1	33 57,97
44													34 58
45													
46													
47													
48													
49													
50													
51													
52													
53													
54													
55													
56													
57													
58													
59													
60													
61													
62													

Tabella 22. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{3,2}(j)$ dei girini della coorte esposta $h=2$, deposizione $i=3$.

deposizione $i=3$ coorte $h=3$															
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,3}(j)$		
3	34														
11				16	18								50,53		
12				10	23	1							50,74		
13					28	6							51,18		
14					20	14							51,41		
15					7	23	4						51,91		
16					1	22	11						52,29		
17						13	19	2					52,68		
18						1	23	5					53,14		
19						1	20	13					53,35		
20							8	23	3				53,85		
21							2	24	8				54,18		
22								16	17	1			54,56		
23								8	21	5			54,91		
24								4	19	11			55,21		
25								3	14	17			55,41		
26								3	7	23	1		55,65		
27								1	4	26	3		55,91		
28								1	2	24	7		56,09		
29								2	19	11	2		56,38		
30								2	11	18	3		56,65		
31								1	8	19	6		56,88		
32								1	4	18	11		57,15		
33									3	18	13		57,29		
34									3	13	18		57,44		
35									2	13	19		57,5		
36									2	9	23		57,62		
37									2	6	26		57,71		
38									2	4	28		57,76		
39										4	30		57,88		
40										4	30		57,88		
41										3	31		57,91		
42										3	31		57,91		
43										2	32		57,94		
44										1	33		57,97		
45										1	33		57,97		
46											34		58		
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
55															
56															
57															
58															
59															
60															
61															
62															

Tabella 23. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{3,3}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=3$, deposizione $i=3$.

deposizione $i=3$ coorte $h=4$															
λk	39	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	$K_{3,4}(j)$		
3	34														
11					14	20							50,59		
12					7	26	1						50,82		
13						27	7						51,21		
14						18	16						51,47		
15						7	22	5					51,94		
16						1	20	13					52,35		
17							12	19	3				52,74		
18							1	26	7				53,18		
19							1	17	16				53,44		
20								7	23	4			53,91		
21								1	23	10			54,26		
22									15	17	2		54,62		
23									7	21	6		54,97		
24									3	20	11		55,24		
25									2	16	16		55,41		
26									2	7	23	2	55,74		
27									1	2	27	4	56		
28									1	2	23	8	56,12		
29										2	18	12	2	56,41	
30										1	11	18	4	56,74	
31											8	20	6	56,94	
32											6	17	11	57,15	
33											3	17	14	57,32	
34											2	13	19	57,5	
35											1	11	22	57,62	
36											1	9	24	57,68	
37											1	7	26	57,74	
38												6	28	57,82	
39												4	30	57,88	
40												2	32	57,94	
41												2	32	57,94	
42												1	33	57,97	
43												1	33	57,97	
44													34	58	
45															
46															
47															
48															
49															
50															
51															
52															
53															
54															
55															
56															
57															
58															
59															
60															
61															
62															

Tabella 24. Serie II. MSF e stadio medio pesato $K_{3,4}(j)$ dei girini della coorte di controllo $h=4$, deposizione $i=3$.

BIBLIOGRAFIA

- Adair R.K., 1991. Constraints on biological effects of weak extremely-low-frequency electromagnetic fields. *Phys Rev A* 43, 1039–1048.
- Adey W.R., 1979. Long-range electromagnetic field interactions at brain cell surfaces. In: Tenforde T.S. (ed) *Magnetic field effects on biological systems*. Plenum, New York, 57–80.
- Adey W.R. 1988. The cellular microenvironment and signaling through cell membranes. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 257, 81-106.
- Ageno M., 1994. *Cos'è la vita*. Ed. Lombardo, Roma.
- Alilla R., 2001. Effetti sub-letali della radiazione ultravioletta: un legame col fenomeno della scomparsa degli Anfibi a scala globale. Tesi di Laurea in Scienze Ambientali, Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.
- Balcavage W.X., Alvager T., Swez J., Goff C.W., Fox M.T., Abdullyava S., King M.W., 1996. A mechanism for action of extremely low frequency electromagnetic fields on biological systems, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 222, 374–378.
- Bayarri M.J., Madrid J.A., Sánchez-Vázquez F.J., 2002. Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *J. Pineal Res.*, 32, 34–40.
- Berk, L. 1938. Studies in the reproduction of *Xenopus laevis*. I. The relation of the external environmental factors to the sexual cycle. *S. Afr. J. Med Sci.*, 3, 72–77
- Bawin SM, Kaczmarek LK, Adey WR. 1975. Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 247, 74–81.
- Blackman CF, Benane SG, Kinney LS, Joines WT, House DE. 1982. Effects of ELF Fields on Calcium-Ion Efflux from Brain Tissue in Vitro. *Radiation Research* 92(3): 510–520.
- Blackman C.F., Benane S.G., Rabinowitz J.R., House D.E., Joines W.T., 1985. A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue in vitro. *Bioelectromagnetics* 6, 327–337.
- Blask D.E., 1993. Melatonin in oncology. In: *Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications* (Yu H-S, Reiter RJ, eds). Boca Raton, FL: CRC Press, 447-475.

- Breaux C.B., Meier A.H., 1971. Diurnal periodicity in the effectiveness of prolactin to inhibit metamorphosis in *Rana pipiens* tadpoles. *Am. Midl. Nat.*, 85, 267–271.
- Bubenik G.A., Pang S.F., 1997. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 106, 415–419.
- Cameron I.L., Hunter K.E., Winters W.D., 1985. Retardation of embryogenesis by extremely low frequency 60 Hz electromagnetic fields. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 17, 135–138.
- Charlton H.M., 1968. The pineal gland of *Xenopus laevis*, Daudin: a histological, histochemical, and electron microscopic study. *Gen Comp Endocrinol.*, 11, 3, 465–80.
- Cocco P., Dosemeci M., Heineman E.F., 1998. Occupational risk factors for cancer of the central nervous system: a case-control study on death certificates from 24 U.S. states. *Am. J. Ind. Med.* 33, 247.
- Cocco P., Heineman E.F., Dosemeci M., 1999. Occupational risk factors for cancer of the central nervous system (CNS) among women. *Am. J. Ind. Med.*, 36, 70.
- Cotronei G., 1945. *Biologia e zoologia generale*. Universitas.
- Curry G.L., Feldman R.M., 1987. *Mathematical foundation of population dynamics*. Texas A&M University press.
- Cuvier G., 1829. *Le Règne Animal*. Distribué d’après son organisation pour servir de base à l’histoire naturelle des animaux et d’introduction à l’anatomie comparée. Chez Déterville et chez Crochard, Paris, 2.
- D’Ancona U., 1965. *Trattato di Zoologia*, UTET, Torino.
- Del Giudice E., Fleischmann M., Preparata, Talpo G., 2002. On the “Unreasonable” effects of ELF magnetic fields upon a system of ions. *Bioelectromagnetics* 23, 522–530.
- Delgado M.J., Vivien-Roels B., 1989. Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perizi*: importance of ocular melatonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75, 46–53.
- Delgado J.M.R., Leal J., Moneagudo J.L., Gracia G. 1982. Embryological changes induced by weak ELF EMF. *J. Anat.* 134, 533–551.
- Delgado M.J., Gutierrez P., Alonso-Bedate M., 1987. Melatonin and photoperiod alter growth and larval development in *Xenopus laevis* tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol. A* 86, 417–421.
- Deuchar E.M., 1975. *Xenopus: the South African clawed frog*. John Wiley and Sons, London.
- Dobzhansky T., 1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia UP, New York.

- Edwards M.L.O., Pivorun E.B., 1991. The effects of photoperiod and different dosages of melatonin on metamorphic rate and weight gain in *Xenopus laevis* tadpoles. Gen. Comp. Endocrinol. 81, 28–38.
- Farndale R.W., Maroudas A., Marsland T.P., 1987. Effects of low-amplitude pulsed magnetic fields on cellular ion transport. Bioelectromagnetics 8, 119–34.
- Farrel J.M., Litovitz T.L., Penafiel M., Montrose C.J., Doinov P., Barber M., Brown K.M., Litovitz T.L. 1997. The effect of pulsed and sinusoidal MF on the morphology of developing chick embryos. Bioelectromagnetics 18, 431–438.
- Feychting M., Ahlbom A., 1994. Magnetic-fields, leukemia and central nervous system tumors in Swedish adults resident near high-voltage power lines. Epidemiology, 5, 501.
- Fulton J.P., Cobb S., Preble L., Leone L., Forman E., 1980. Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode Island, Am. J. Epidemiol., 111(3), 292.
- Gasser P.J., Gern W.A., 1997. Regulation of melatonin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pineal organs: effects of calcium depletion and calcium channel drugs. Gen. Comp. Endocrinol., 105, 210–217.
- Green C. B., Liang M.Y., Steenhard B.M., Besharse J.C., 1999. Ontogeny of circadian and light regulation of melatonin release in *Xenopus laevis* embryos. Developmental Brain Research 117, 109–116.
- Harrison N. L., Zatz M., 1989. Voltage-Dependent Calcium Channels Regulate Melatonin Output from Cultured Chick Pineal Cells. The Journal of Neuroscience, 7, 2482–2487.
- Juutilainen J., Lang S., 1997. Genotoxic carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. Mutation Res., 387, 165–171.
- Juutilainen J., Saali K. 1986. Development of chick embryos in 1 to 1 kHz MF. Radiat. Env. Biophys. 25, 135–140.
- Juutilainen J., Harri M., Saali K., Lahtinen T., 1986. Effects of 100-Hz magnetic fields with various waveforms on the development of chick embryos. Radiat Environ Biophys 25:65–74.
- Kaczmarek L.K., Adey W.R., 1974. Weak electric gradients change ionic and transmitter fluxes in cortex. Brain Res. 66, 537–540.
- Kalk M., 1960. Climate and breeding in *Xenopus laevis*. S. Afr. J. Sci.
- Kato M., Honma K., Shigemitsu T., Shiga Y., 1993. Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma melatonin levels in rats. Bioelectromagnetics 14, 97–106.

- Kheifets L., 2001. Electric and magnetic field exposure and brain cancer. A review. *Bioelectromagnetics* suppl. 5, 120.
- Kheifets L.I., Sussman S.S., Preston-Martin S., 1999. Childhood brain tumors and residential electromagnetic fields (EMF). *Rev. Environ Contam Toxicol.*, 159, 111.
- Kliukiene J., Tynes T., Martinsen J.L., Blaasaas K.G., Andersen A., 1999. Incidence of breast cancer in a Norwegian cohort of women with potential workplace exposure to 50 Hz magnetic field. *Am. J. Ind. Med.*, 36, 147.
- Koch W., Koch B., Martin A., Moses G.C. 1993. Examination of the development of chicken embryos following exposure to magnetic fields. *Comp. Biochem. Physiol.* 105, 615–624.
- Kula B., Drozd M. 1996. A study of magnetic field effects on fibroblast cultures Part 1. The evaluation of effects of static and extremely low frequency (ELF) magnetic fields on vital functions of fibroblasts. *Bioelectrochem. & Bioenerg.*, 39, 21–26.
- Kwee S., Raskmark P., 1995. Changes in cell proliferation due to environmental non-ionizing radiation 1. ELF electromagnetic fields. *Bioelectrochem. & Bioenerg.*, 36, 109–114.
- Leal J, Shamsaifar K, Trillo MA, Ubeda A, Abaira V, Chacon L. 1989. Embryonic development and weak changes of the geomagnetic field. *J Bioelectr* 7:141–153.
- Lee J.M., Stormshak F., Thompson J.M., 1993. Melatonin secretion and puberty in female lambs exposed to environmental electric and magnetic fields. *Biol Reprod* 49, 857-864.
- Lerchl A., Reiter R. J., Howes K. A., Nonaka K. O., Stokkan K. A. 1991. Evidence that extremely low frequency Ca(2+)-cyclotron resonance depresses pineal melatonin in vitro. *Neurosci. Lett.* 124, 213–215.
- Liboff A.R., 1985. Cyclotron resonance in membrane transport. In Chiabrera A, Nicolini C, Schwan HP, editors. *Interactions between electromagnetic fields and cells*. London: Plenum Press, 281–296.
- Liboff A.R., Smith S.D., McLeod B.R., 1987. Experimental evidence for ion cyclotron resonance mediation of membrane transport. In Blank M, Findl E, editors. *Mechanistic approaches to interactions of electric and electromagnetic fields with living systems*. New York and London: Plenum Press, 109–132.
- Liboff AR, Smith SD, McLeod BR. 1987. Experimental evidence for ion cyclotron resonance mediation of membrane transport. In Blank M, Findl E, editors. *Mechanistic approaches to interactions of electric and electromagnetic fields with living systems*. New York and London: Plenum Press 109–132.

- Liburdy R.P., Callahan D.E., Harland J., Dunham E., Sloma T.R., Yaswen P., 1993. Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. Effects on calcium influx and c-MYC mRNA induction. *FEBS Lett* 334, 301–308.
- Lin S. R., and Lu P.Y., 1989. An epidemiological study of childhood cancer in relation to residential exposure to electromagnetic fields, Abs. DOE/EPRI Contractors Meeting, Portland , Oregon.
- Lindström E., Lindström P., Berglund A., Mild K.H., Lundgren E., 1993. Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by weak 50-Hz magnetic-field. *J. Cell Physiol.* 156, 335–339.
- London S.J., Thomas D.C., Bowman J.D., Sobel E., Cheng T.C., Peters J.M. 1991. Exposure to residential electric and magnetic fields and risk of childhood leukemia, *Am. J. Epidemiol.* 134, 923.
- Loscher W., Wahnschaffe U., Mevissen M., Lerchl A., Stamm A., 1994. Effects of weak alternating magnetic fields on nocturnal melatonin production and mammary carcinogenesis in rats. *Oncology*, 51, 288-295.
- Löschinger M., Thumm S., Hammerle H., Rodemann H.P., 1999. Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblast populations by sinusoidal extremely low-frequency magnetic fields (20 Hz, 8 mT) is dependent on the differentiation state of the single cell. *Radiat Res.* 151, 195–200.
- Lotka A.J., 1925. *Elements of physical biology.* Williams & Wilkins, Baltimore.
- Maffeo S, Miller M, Carstensen E. 1984. Lack of effect of weak low-frequency EMF on chick embryogenesis. *J Anatomy* 139: 613–618.
- Malthus T.R., 1798. *An essay on the principle of population.* J. Johnson, London.
- Manetsch T. J., 1976. Time varying distributed delays and their use in aggregative models of large systems. *IEEE Trans System, Man and Cybern*, 6, 547-553.
- Manly B.F., 1989. A review of methods for the analysis of stage-frequency data. In: *Estimation and Analysis of Insect Populations* (L. McDonald et al. eds.). *Lecture Notes in Statistics*, 55, Springer, Berlin, 492.
- Martin A.H. 1992. Development of chicken embryos following exposure to 60 Hz MF with differing waveforms. *Bioelectromagnetics* 13, 223–230.
- Mattsson M.O., Lindstrom E., Still M., Lindström P., Mild K.H., Lundgren E., 2001. $[Ca^{2+}]_i$ rise in Jurkat E6-1 cell lines from different sources as a response to 50 Hz

- magnetic field exposure is a reproducible effect and independent of poly-L-lysine treatment. *Cell Biol. Int.*, 25, 901–907.
- Mayr E., 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia UP, New York.
- Mc Cann J., Dietrich F., Rafferty C., 1998. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutation Res.*, 411, 45–86.
- McCann J., Dietrich F., Rafferty C., Martin A.O., 1993. A critical review of genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutation Res.* 297, 61–95.
- McCormick D.L., Cahill M.A., Harder J.B., 1994. Pineal function assessment in F344 rats and B6C3F1 mice exposed to 60 Hz magnetic fields. Presented at 16th Annual Meeting of the Bioelectromagnetics Society, Copenhagen, Denmark, 12–17.
- McKendrick A.G., 1926. Application of mathematics to medical problems. *Proc. Edinburgh Math. Soc.* 44, 98–130.
- Meier A.H., 1975. Chronophysiology of prolactin in the lower vertebrates. *Am. Zool.* 15, 905–916.
- Meyer A.C., Nieuwenhuis J.J., Kociszwska W.S., Joubert W.S., Meyer B.J., 1986. Dihydropyridine calcium antagonists depress the amplitude of the plasma melatonin cycle in baboons. *Life Sci.*, 39, 1536–1569.
- Morton D., Reiter R.J., Buzzel G.R., 1989. Swimming-induced suppression of rat pineal melatonin is prevented by pretreatment with calcium channel blockers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 190, 105–108.
- Murphy J.C., Kaden D.A., Warren J., Sivak, A. 1993. Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology. *Mutation Res.*, 296: 221–240;
- Myers A., Clayden A.D., Cartwright R.A., 1989. Childhood cancer and overhead powerlines: a case-control study. *Br. J. Cancer*, 63, 977.
- Nanda K.K., Hamner K.C., 1958. Studies on the nature of the endogenous rhythm affecting photoperiodic response of Biloxi soybean. *Botanical Gazette* 120, 14–25.
- Nieuwkoop P., Faber J., 1956. *Normal table of Xenopus laevis*. North Holland, Amsterdam.
- Nikaido S.S., Takahashi J.S., 1996. Calcium modulates circadian variation in cAMP-stimulated melatonin in chick pineal cells. *Brain Res.* 716, 1–10.
- Olcese J., Reuss S., 1986. Magnetic field effects on pineal gland melatonin synthesis: comparative studies on albino and pigmented rodents. *Brain Res* 369, 365–368.

- Paile W., Jokela K., Koivistoinen A., Salomaa S., 1995. Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields and spark discharges on human lymphocytes in vitro. *Bioelectrochem. & Bioenerg.*, 36, 15–22.
- Panagopoulos D.J., Karabarbounis A., Margaritisa L.H., 2002. Mechanism for action of electromagnetic fields on cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 298, 95–102.
- Panagopoulos D.J., Messini N., Karabarbounis A., Philippetis A.L., and Margaritis L.H., 2000. A mechanism for action of oscillating electric fields on cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 272, 634–640.
- Pearl R., 1925. *The biology of population growth*. Alfred A. Knopf Ed., New York
- Plant R.E., Wilson L.T., 1986. Models for age structured populations with distributed maturation rates. *J. Math. Biol.*, 23, 247–262.
- Podolsky A.S., 1984. *New Phenology*. J. Wiley & Sons, New York .
- Polk C., 1991. Biological effect of low-level low-frequency electric and magnetic fields. *IEEE Transaction on Education*, 34. 243–249.
- Preparata G., 1995. *QED Coherence in Matter*. Singapore, New Jersey, London, Hong Kong: World Scientific.
- Ptitsyna N.G., Villoresi G., Dorman L.I., Iucci N., Tyasto M.I., 1998. Natural and man-made low-frequency magnetic fields as a potential health hazard. *Physics-Uspekhi* 41, 7, 687–709.
- Reaumur R.A., 1735. Observation du thermomètre, faites à Paris pendant l'année 1735, comparées avec celles qui ont été faites sous la ligne, à l'Isle de France, à Alger et en quelques-unes de nos isles de l'Amerique. *Mém. Acad. des Sci.*, Paris.
- Reiter R., 1998. Melatonin in the context of the reported bioeffects of environmental electromagnetic fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 47, 135–142.
- Reiter R.J., Anderson L.E., Buschbom R.L., Wilson B.W., 1988. Reduction of the nocturnal rise in pineal melatonin levels in rats exposed to 60-Hz electric fields in utero and for 23 days after birth. *Life Sci* 42, 2203–2206.
- Ricklefs R. E., 1976. *Ecologia*, Zanichelli, Bologna.
- Salti R., Tarquini R., Stagi S., Perfetto F., Cornélissen G., Laffi G., Mazzocchi G., Halberg F., 2006. Age-dependent association of exposure to television screen with children's urinary melatonin excretion? *Neuroendocrinol Lett*, 27(1-2), 73–80.

- Sandstrom M, Mild KH, Lovtrup S. 1986. Effects of weak-pulsed MF on chick embryogenesis. In: Knave B, Widebäck PG editors. Work with display units. Amsterdam: Elsevier Sci Publ pp. 135–140.
- Santana C., Moujir F., Sanchez J.J., Reiter R.J., Abreu P., 2001. Role of extracellular calcium on the regulation of melatonin synthesis in the Syrian hamster pineal gland. *J. Pineal Res.*, 31, 289–293.
- Sasser L.B., Morris J.E., Miller D.L., Anderson L.E., 1992. Pineal function in rats acutely exposed to magnetic fields. Presented at the DOE Contractor's Review, San Diego, 8-12.
- Savitz D.A., Wachtel H., Barnes F.A., John E.M., Tvrdik J.G., 1988. Case-control study of childhood cancer and exposure to 60 Hz magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.* 128, 21.
- Scarfi M.R., Lioi M.B., 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(3), 244–250.
- Semm P., Schneider T., Vollrath L., 1980. Effects of an earth-strength magnetic field on electrical activity of pineal cells. *Nature*, 288, 607-608.
- Severini M., Dattilo A.M., De Gaetano A., 2003. Sublethal effect of a weak intermittent magnetic field on the development of *Xenopus laevis* (Daudin) tadpoles. *Int. J. Biometeorol.* 48, 91-97.
- Severini M., Alilla R., Loy M., Bonori M., Giuliani L., Bedini A., Giliberti C., Palomba R., Giacomozzi E., Congiu Castellano A., Metamorphosis delay in *Xenopus laevis* (Daudin) tadpoles exposed to two 50 Hz magnetic fields of different amplitudes. *International Journal of Radiation Biology*, in review.
- Severson R.K., Stevens R.G., Kraune W.T., Thomas D.B., Server L., 1988. Acute non-lymphocytic leukemia and residential exposure to power frequency magnetic fields, *Am. J. Epidemiol.*, 128, 10.
- Shimizu F., Sanada K., Fukada Y., 2003. Purification and immunohistochemical analysis of calcium-binding proteins expressed in the chick pineal gland. *J. Pineal Res.* 34, 208–216.
- Shimizu H., Suzuki Y., and Okonogi H., 1995. Biological effects of electromagnetic fields. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 50, 919.
- Silver R.B., Inoue S., 1987. Calcium transients are required for mitosis. *Biol. Bull.*, 173, 420-421.

- Simkò M., Mattsson M.O., 2004. Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *Journal of Cellular Biochemistry* 93, 83–92.
- Sisken B.F., Fowler I., Mayaud C., Ryaby J.P., Pilla A. 1986. Pulsed EMF and normal chick development. *J Bioelectr* 5, 25–34.
- Smith SD, McLeod BR, Liboff AR, Cooksey K. 1987. Calcium cyclotron resonance and diatom mobility. *Bioelectromagnetics*, 8, 3, 215–227.
- Spiegel M.R., 1994. Probability and statistics. McGraw-Hill, New York.
- Stehle J., Reuss S., Schrder H., Henschel M., Vollrath L., 1988. Magnetic field effects on pineal N-acetyltransferase activity and melatonin content in the Gerbil-role of pigmentation and sex. *Physiol Behav.*, 44, 91-94.
- Stevens R.G., 1993. Biologically based epidemiological studies of electric power and cancer. *Environ Health Perspect* 101, Suppl, 4, 93-100.
- Stevens R.G., Davis S., 1996. The Melatonin Hypothesis: Electric Power and Breast Cancer. *Environmental Health Perspectives*, 104, 1, 135-140.
- Sudgen D., 1989. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. *Experientia* 45, 922–932.
- Tomenius L., 1986. 50-Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm country. *Bioelectromagnetics* 7, 191.
- Ubeda A, Leal J, Trillo M, Chacon L, Jimenez MA, Delgado JMR., 1983. Pulse shape of MF influences chick embryogenesis. *J Anatomy*, 137, 513–536.
- Ubeda A, Trillo M, Chacon L, Leal J, Blanco L. 1994. Chick embryo development can be irreversibly altered by early exposure to weak ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15: 385–398.
- Vecchia P., 1997. The health risks of exposure to electromagnetic fields on work environments. *Med. Lav.*, 88, 6, 462.
- Verhulst P.F., 1845. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Nouv. mém. de l'Académie Royale des Sci. et Belles-Lettres de Bruxelles*. 18, 3–38.
- Verschaeve L., 1995. Electromagnetic fields and cancer. *Cancer Journal*, 34, 125–31.
- Volterra V., 1926. Variations and fluctuations of the number of individuals in animal species living together. In *Animal ecology* (Chapman R.N. ed.), New York, McGraw-Hill, 409-448.

- Von Foerster H. , 1959. Some remarks on changing populations. The kinetics of cellular proliferation (F. Stohlman Jr ed.), . Grune & Stratton, New York, 382-407.
- Walleczek J., Liburdy R.P., 1990. Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation. FEBS Lett. 271, 157–60.
- Welker H.A., Semm P., Willig R.P., Commentz J.C., Wiltchko W., Vollrath L., 1983. Effects of an artificial magnetic field on serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of the rat pineal gland. Exp Brain Res 50:426-432.
- Wertheimer N., Leeper E., 1979. Electrical wiring configurations and childhood cancer. Am. J. Epidemiol., 109, 273.
- Wilson B.W., Anderson L.E., Hilton D.I., Phillips R.D., 1981. Chronic exposure to 60-Hz electric fields: effects on pineal function in the rat. Bioelectromagnetics, 2, 371-380.
- Wolniak S.M., 1988. The regulation of mitotic spindle function. Biochem. Cell. Biol., 66, 490-514.
- Wright M.L., 2002. Melatonin, diel rhythms, and metamorphosis in anuran amphibians. Gen. Comp. Endocrinol. 126, 251-254.
- Wright M.L., Alves C.D., 2001. The decrease in plasma melatonin at metamorphic climax in *Rana catesbeiana* tadpoles is induced by thyroxine. Comp. Biochem. Physiol. A 129, 653–663.
- Wright M., Racine C., 1997. Inverse relationship between plasma T4 and plasma and ocular melatonin in prometamorphic and climax (*Rana catesbeiana*) bullfrog tadpoles. In: Kawashima, S., Kikuyama, S. (Eds.), Advances in Comparative Endocrinology. Monduzzi Editore, Bologna, 403–407.
- Wright M. L., Pikula A., Cykowski L. J., Kuliga K., 1996. Effect of melatonin on the anuran thyroid gland: Follicle cell proliferation, morphometry, and subsequent thyroid hormone secretion *in vitro* after melatonin treatment *in vivo*. Gen. Comp. Endocrinol. 103, 182–191.
- Wright M.L., Blanchard L.S., Jorey S.T., Basso C.A., Myers Y.M., Paquette C.M., 1990. Metamorphic rate as a function of the light/dark cycle in *Rana pipiens* larvae. Comp. Biochem. Physiol. A 96, 215–220.
- Wright M.L., Pikula A., Babski A.M., Labieniec K.E., and Wolan R.B., 1997. Effect of Melatonin on the Response of the Thyroid to Thyrotropin Stimulation *in Vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 108, 298-305.

- Wright M.L., Jorey S.T., Myers Y.M., Fieldstad M.L., Paquette C.M., Clark M.B., 1988. Influence of photoperiod, daylength, and feeding schedule on tadpole growth and development. *Dev.Growth Differ.* 30, 315–323.
- Wright M.L., Cykowski L.J., Mayrand S.M., Blanchard L.S., Kraszewska A.A., Gonzales M., Patnaude M., 1991. Influence of melatonin on the rate of *Rana pipiens* tadpole metamorphosis in vivo and regression of thyroxine-treated tail tips in vitro. *Dev. Growth Differ.* 33, 243–249.
- Yellon S.M., 1994. Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster. *J Pined Res*, 16, 136–144.
- Youbicier-Simo B., Boudard F., Cabaner C., Bastide M. 1997. Biological effects of continuous exposure of embryos and young chickens to EMF emitted by VDU. *Bioelectromagnetics* 18, 514–523.
- Youngson J.H.A.M., Clayden A.D., Myers A., Cartwright R.A.A., 1991. Case-control study of adult haematological malignancies in relation to overhead powerlines, *Br. J. Cancer*, 63, 977.
- Zatz M., 1989. Relationship between light, calcium influx and cAMP in the acute regulation of melatonin production by cultured chick pineal cells. *Brain Research*, 477, 14–18.
- Zatz M., Mullen D.A., 1988. Does calcium influx regulate melatonin production through the circadian pacemaker in chick pineal cells? Effects of nitrendipine, Bay K 8644, Co^{2+} , Mn^{2+} , and low external Ca^{2+} . *Brain Res.* 463, 305–316.
- Zhadin M.N., Novikov V.V., Barnes F.S., Pergola N.F., 1998. Combined action of static and alternating magnetic fields on ionic current in aqueous glutamic acid solution. *Bioelectromagnetics* 19, 41–45.
- Zimmerman S., Zimmerman A.M., Winters W.D., Cameron I.L., 1990. Influence of 60 Hz magnetic fields on Sea Urchin development. *Bioelectromagnetics*, 11, 37–45.
- Zusman I., Yaffe P., Pinus H., Ornoy A., 1990. Effects of pulsing electromagnetic fields on the prenatal and postnatal development in mice and rats: in vivo and in vitro studies. *Teratology*, 42, 157–170.

Abstract

Developmental delay of *Xenopus laevis* cohorts in prometamorphosis exposed to weak low frequency magnetic fields and comparison of retina's melatonin concentration between exposed and control cohorts.

Objective of my doctor's degree thesis was to confirm by experiments that exposure of *Xenopus laevis* (Daudin) tadpoles to weak low frequency magnetic fields can slow down animal's ontogenetic development, to check particular amplitude-frequency combinations of magnetic fields in promoting this phenomenon, and to attempt, still through experiments, understanding if melatonin can be considered as a target molecule of magnetic energy. I proposed this research starting from the results of a previous one, in which my tutor observed a significant ($P < 0.001$) metamorphosis delay in *X. laevis* tadpoles exposed to the magnetic field of a TV set [Severini et al., 2003]. It is well known that TV magnetic field has a 'saw-tooth' shape, and that it consists of different harmonic components; then, it is not possible to ascertain which frequency-amplitude combination(s) of TV magnetic field is responsible of the observed maturation retard. In order to check the role of different amplitude-frequency magnetic field combinations in causing *X. laevis* developmental retard, a tuneable solenoid in which aquariums with tadpoles can be lodged for long (toxic) exposures was planned and constructed. With this solenoid as magnetic field source were performed six experiments: three in the first year and the remaining three in the second. In the third year, when the role of melatonin was taken into consideration, tadpoles were exposed to a magnetic field emitted from a TV device, as in the former Severini's experiments.

In the three experiments of the first year, four cohorts of 35 tadpoles were reared in aquariums in comparable conditions (of temperature, water availability, feeding and photoperiod). Two of them were exposed inside the solenoid to two slightly different combination of magnetic field frequency and intensity: (50 Hz, 71.1 μT rms) and (50 Hz, 73.7 μT rms), respectively. The remaining two cohorts, the control ones, were exposed to static geomagnetic field (20,6 μT) and background variable field (0.05 μT) [Severini, Alilla et al., in review]. The statistical analysis of results via two way ANOVA shows that the strongest ELF magnetic field (73.7 μT rms) causes a highly significant metamorphosis delay (4.05 days, $P < 0.001$) with respect to the controls, whereas the retard caused from the weakest one (71.1 μT rms) is smaller (1.57 days) and not significant ($P < .40$). This result not only confirms that magnetic exposure can slow down tadpoles development, but it also suggests that a sharp intensity threshold between 71 μT rms and 74 μT rms

(amplitude 100 μT and 104 μT) must exist in considering developmental retards associated to exposures to 50 Hz electromagnetic fields.

In each of the three experiments of the second year, two cohorts were exposed to the same frequency-intensity combinations of magnetic field in the solenoid: (50 Hz, 71.1 μT rms) and (50 Hz, 73.7 μT rms) with the following difference as to the first year. Then, the constant static (geomagnetic) field was (20,6 μT), while in the new series of experiments the constant static magnetic field in the solenoid was augmented artificially up to 65 μT . This was done to perform this series of experiments in condition of Ca^{2+} cyclotron resonance, according to Liboff's theory [Liboff, 1985] and to check if this theory could explain (at least partially) the observed retards. The results show that the magnetic field Ca^{2+} cyclotron resonance produced a significant developmental delay (0.86 days, $P < .05$), though shorter than that of the first series. Comparing the results of the last three experiments in the solenoid to the former three, we can exclude that calcium ions play an important role in retarding metamorphosis via cyclotronic resonance. This is in agreement with the main criticism of the Liboff's theory, according to which thermal molecular agitation in matter destroys the effects of cyclotronic resonance [Adair, 1991]. In conclusion, cellular calcium ions cannot be considered as target molecules of electromagnetic photons in biological matter.

In attempt to find a biological mediator between electromagnetic long wave radiation and developmental delay, the third year of my research was dedicated to investigate the role of melatonin. In Amphibians, metamorphosis is induced by a gradual rise in the thyroid hormones (TH) that get to their maximum values during metamorphic climax. Melatonin has an inhibitory effect on the thyroid hormones in all stages of the life cycle [Wright et al., 2000] and it is considered a mediator of electromagnetic fields [Reiter, 1998]. In my two experiments I exposed a cohort of *X. laevis* tadpoles to the magnetic field emitted by a TV set, as in Severini's experiment [2003].

Removal of *Xenopus* retinas started during animal's prometamorphosis about at stage 55, according to Nieuwkoop & Faber classification [1956], and melatonin concentrations was measured by the ELISA (IBL-Hamburg) test. The results show that melatonin in *Xenopus* retinas has a circadian rhythm of synthesis with high levels at night and low levels during the day. Up to now, it was known that *X. laevis* retinas synthesize and release melatonin rhythmically in early embryonic and larval stages (26 and 47) [Green et al., 1999]; our results show that this happens also in prometamorphosis. The exposure to the TV set magnetic field caused a developmental slow down already significant three weeks after

oviposition, however, the difference between melatonin concentrations of exposed and unexposed cohorts does not result significant. It is known that melatonin concentrations decrease as *X. laevis* tadpoles approach metamorphosis, and presumably, differences in melatonin concentrations between exposed and not exposed tadpoles progressively diminish. As consequence, the number of removed retinas must increase with respect to as we did in order to show a difference of retinal melatonin concentration between exposed and not exposed tadpoles.

Riassunto

Ritardo di sviluppo di coorti di *Xenopus laevis* in prometamorfosi esposte a campi magnetici a bassa frequenza e confronto del contenuto di melatonina retinica tra esposti e controll.

Lo scopo della mia Tesi di Dottorato di Ricerca era di confermare, mediante esperimenti, che l'esposizione di girini di *Xenopus laevis* (Daudin) a deboli campo a bassa frequenza può rallentare lo sviluppo ontogenetico di questi animali, verificare l'esistenza di particolari combinazioni di ampiezza-frequenza del campo magnetico in grado di promuovere questo fenomeno, e tentare, sempre sperimentalmente, di comprendere se la melatonina possa avere il ruolo di molecola 'target' per l'energia magnetica. Ho proposto questa ricerca sulla base dei risultati di una precedente, in cui il mio tutor aveva osservato un ritardo significativo ($P < 0.001$) della metamorfosi in girini di *X. laevis* esposti al campo magnetico di un apparecchio televisivo [Severini et al., 2003]. E' noto che il televisore possiede un campo magnetico con forma d'onda a 'dente di sega', costituito da differenti componenti armoniche; pertanto, non è possibile definire quale combinazione(i) di frequenza-ampiezza emessa dal televisore è responsabile del ritardo di maturazione osservato. Al fine di comprendere il ruolo delle differenti combinazioni di frequenza-ampiezza nel causare ritardo di sviluppo in *X. laevis*, è stato progettato e costruito un solenoide in cui potessero essere posizionati gli acquari contenenti i girini per esposizioni prolungate. Impiegando questo solenoide come sorgente di campo magnetico sono stati eseguiti sei esperimenti: tre durante il primo anno ed i restanti tre durante il secondo. Nel terzo anno, quando è stato preso in considerazione il ruolo della melatonina, i girini sono stati esposti al campo magnetico emesso da un apparecchio televisivo, come nei precedenti esperimenti condotti da Severini.

Nei tre esperimenti del primo anno, sono state allevate quattro coorti di 35 girini in acquari nelle stesse condizioni (di temperatura, disponibilità d'acqua, dieta e fotoperiodo). Due delle quali erano esposte all'interno del solenoide a due combinazioni leggermente differenti di frequenza ed intensità del campo magnetico: (50 Hz, 71.1 μT rms) e (50 Hz, 73.7 μT rms), rispettivamente. Le altre due coorti, quelle di controllo, erano esposte al campo geomagnetico statico (20,6 μT) ed al campo variabile di fondo (0.05 μT) [Severini, Alilla et al., in review]. I risultati dell'analisi statistica ANOVA a due vie mostrano che il campo magnetico ELF più intenso (73.7 μT rms) causa un ritardo di sviluppo altamente significativo (4.05 giorni, $P < 0.001$) rispetto ai controlli, mentre il ritardo dovuto al campo più debole (71.1 μT rms) è inferiore (1.57 giorni) e non significativo ($P < .40$). Questo

risultato non conferma solo che l'esposizione al campo magnetico rallenta lo sviluppo dei girini, ma suggerisce inoltre l'esistenza di una soglia di intensità tra 71 $\mu\text{T rms}$ e 74 $\mu\text{T rms}$ (rispettivamente di ampiezza 100 μT e 104 μT) associata all'esposizione dei girini ad un campo magnetico a 50 Hz.

In ognuno dei tre esperimenti del secondo anno, due coorti erano esposte alle stesse combinazioni di frequenza-ampiezza del campo generato all'interno del solenoide: (50 Hz, 71.1 $\mu\text{T rms}$) and (50 Hz, 73.7 $\mu\text{T rms}$) con una sola differenza rispetto agli esperimenti del primo anno. Nella prima serie il campo statico (geomagnetico) era (20,6 μT), nella seconda il campo statico all'interno del solenoide è stato aumentato fino a raggiungere 65 μT . Questa operazione è stata eseguita per condurre la seconda serie di esperimenti in condizioni di risonanza di ciclotrone del Ca^{2+} , in accordo con la teoria di Liboff [Liboff, 1985], e capire se questa teoria può spiegare (almeno in parte) i ritardi osservati. I risultati mostrano che il campo magnetico alla frequenza di risonanza di ciclotrone del Ca^{2+} ha prodotto un ritardo di sviluppo significativo (0.86 days, $P < .05$), benché inferiore a quello della prima serie. Confrontando i risultati dell'ultima serie di esperimenti con quelli della prima, possiamo escludere che gli ioni calcio giochino un ruolo importante nel ritardare la metamorfosi in condizioni di risonanza. Ciò è in accordo con la critica principale alla teoria di Liboff, per la quale l'agitazione termica delle molecole nella materia distrugge gli effetti della risonanza di ciclotrone [Adair, 1991]. In conclusione, gli ioni calcio non possono essere considerati come molecole 'target' dei fotoni elettromagnetici nella materia biologica.

Nel tentativo di trovare un mediatore biologico tra la radiazione elettromagnetica ad onda lunga ed il ritardo di sviluppo, il terzo anno della mia ricerca è stato dedicato ad indagare il ruolo svolto dalla melatonina. Negli Anfibi, la metamorfosi è indotta da una graduale crescita dell'ormone tiroideo (TH) fino a raggiungere un picco al climax metamorfico. La melatonina ha un effetto inibitorio diretto sull'ormone tiroideo in tutti gli stadi di sviluppo [Wright et al., 2000] and ed è considerata un mediatore dell'azione dei campi elettromagnetici [Reiter, 1998]. Nei miei due esperimenti ho esposto una coorte di girini di *X. laevis* al campo magnetico emesso da un apparecchio televisivo, come negli esperimenti di Severini [2003].

Gli espianti delle retine di *Xenopus* sono iniziate durante la prometamorfosi circa allo stadio 55, secondo la classificazione di Nieuwkoop & Faber [1956], e le concentrazioni di melatonina sono state determinate mediante un test ELISA (IBL-Hamburg). I risultati mostrano che nelle retine di *Xenopus* la melatonina presenta un ritmo circadiano di sintesi

con livelli elevate di notte e livelli bassi di giorno. Fino ad ora, era noto che le retina di *X. laevis* sintetizzasse e rilasciasse la melatonina miticamente in stadi precoci della vita embrionale e larvale (26 e 47) [Green et al., 1999]; i nostri risultati mostrano che ciò avviene anche in prometamorfosi. L'esposizione al campo magnetico del televisore ha causato un rallentamento dello sviluppo già rilevabile tre settimane dopo l'oviposizione, tuttavia, la differenza tra le concentrazioni di melatonina degli esposti e dei controlli non risulta significativa. E' noto che le concentrazioni di melatonina diminuiscono quando i girini di *X. laevis* si avvicinano alla metamorfosi, e presumibilmente, anche le differenze tra esposti e non esposti tendono a diminuire. Come conseguenza, il numero di retine espianate deve aumentare nell'intento di mostrare una differenza tra la concentrazione di melatonina retinica dei girini esposti e non.