RESUMEN

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTOXICO Y CITOTÓXICO DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60Hz EN CELULAS DE MAMÍFERO.

Se evaluaron los efectos genotóxicos y citotóxicos asociados con la exposición a campos electromagnéticos (CEM) de frecuencia extremadamente baja (60 Hz), en modelos *in vitro* e *in vivo* de células de mamífero.Se diseñaron, construyeron y caracterizaron dos sistemas de exposición de material biológico a CEM de 60 Hz; uno para cultivos celulares y otro para ratones de laboratorio. Los modelos biológicos de estudio incluyeron: (a) Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos *in vitro*, (b) Parámetros hematológicos de ratón *in vivo*, (c) Prueba de micronúcleos en médula ósea de ratón *in vivo* y (d) Análisis citogenético en células germinales reproductoras de ratón *in vivo*. Se utilizaron tres intensidades magnéticas; 1.0, 1.5 y 2.0 mT, además de una coexposición simultánea a CEM de 2.0 mT más Mitomicina-C (MMC), un fármaco citotóxico y genotóxico de acción conocida, que además sirvió como testigo positivo en los experimentos y asimismo como control interno. En el caso de los experimentos *in vivo*, se utilizó además un tratamiento de 10 días de exposición, 8 h diarias.

Se encontró que los CEM no alteraron la frecuencia de ICH en cultivos de linfocitos, pero sí incrementaron la proliferación celular de los mismos. Un hallazgo importante en esta etapa, fue el efecto antagónico que se observó entre el CEM y la MMC al evaluarse la cinética de proliferación celular. Por otra parte, los CEM modificaron los parámetros hemáticos de ratones *in vivo* en lo que concierne a una disminución de los linfocitos y un aumento de los neutrófilos. Con respecto al efecto en médula ósea se encontró un aumento en la frecuencia de micronúcleos, indicador de un efecto clastogénico atribuido al CEM. En este caso también se observó el efecto antagónico entre CEM y MMC. Por otro lado, no fue posible demostrar que una exposición a CEM influyera sobre las células germinales de ratón, sin embargo, también en estos experimentos se notó el mismo antagonismo del CEM con respecto al efecto de la MMC.

Con estos resultados, es posible suponer que los CEM de 60 Hz a las dosis aplicadas, son capaces de modificar actividades celulares por lo que esto debería considerado en la estimación del riesgo potencial que representa una exposición laboral o ambiental a este factor.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE GENOTOXIC AND CYTOTOXIC POTENTIAL OF 60 Hz ELECTROMAGNETIC FIELDS IN MAMMALIAN CELLS.

Genotoxic and cytotoxic effects due to the exposure of extremely low frequency magnetic fields (ELF-MF) were evaluated in mammalian cells; *in vitro* and *in vivo*. Two magnetic field exposure facilities were designed and physically characterized for culture cells and animals. The cytological endpoints included: (a) Sister-chromatid exchange (SCE) test in lymphocytes *in vitro*, (b) Haematological parameters of mice *in vivo*, (c) Micronuclei test in mouse bone marrow *in vivo* and (d) Cytogenetic analysis of mice male germ cells *in vivo*. Three magnetic flux densities; 1.0, 1.5 and 2.0 mT were used and a co-exposure condition, combining 2.0 mT ELF-MF and Mytomicin-C (MMC), a well-known mutagen. MMC-treated animals were used as a positive control. Additionally; for *in vivo* experiments, a continuous ten days / 8 h daily exposure was also used.

No alterations in SCE frequencies of exposed lymphocyte cultures were observed, however and increased cell proliferation was detected. Moreover, an antagonistic effect between ELF-MF and MMC was found in term of cell proliferation. On the other hand, the ELF-MF exposure caused a decrease of blood circulatimg lymphocytes and an elevation of neutrophils in exposed animals. In regard to bone marrow effects, an increased micronuclei frequency of treated animals was detected. Furthermore the antagonistic effect between ELF-MF and MMC was also observed. Finally, no alterations on male germ cells of mice exposed to ELF-MF was observed, however the same antagonistic ELF-MF and MMC effect was detected.

These results sugests that ELF-MF at the dosage used, can modify cell activities which should be considered in order to establish the risk associated with magnetic field exposure.

INTRODUCCION

A través de los años ha sido creciente la cantidad de agentes físicos y químicos a los que nos vemos expuestos como producto del desarrollo tecnológico e industrial, en consecuencia también ha aumentado el interés público por los posibles efectos negativos que para la salud pudiera tener la exposición a estos factores ambientales. Si bien para una gran cantidad de éstos (pesticidas, metales pesados, radiaciones ionizantes, etc.) ya se han comprobado efectos adversos para la salud, existen otros agentes que son objeto de gran controversia debido a que sus efectos no han sido determinados con claridad. Quizá el mejor ejemplo de ésto sea la problemática planteada por la exposición a los campos electromagnéticos (CEM) de frecuencia extremadamente baja (60 Hz).

En los últimos 15 años ha existido un creciente interés por la posibilidad de que la exposición a los campos electromagnéticos de 60 Hz, generados por el tendido eléctrico y aparatos electrodomésticos, pudiera tener efectos no deseables en sistemas biológicos. Uno de los aspectos que ha despertado particular interés ha sido el riesgo de sufrir alteraciones citológicas, y en particular genéticas.

Los campos electromagnéticos son producidos cuando una corriente eléctrica fluye a través de un conductor, como por ejemplo en una línea eléctrica. De esta manera, la mayoría de los humanos nos encontramos expuestos a los CEM, los cuales están presentes tanto en ambientes residenciales como laborales. Esto se debe a que a pesar de estar usualmente asociados a líneas eléctricas de alto voltaje y subestaciones eléctricas, también

son producidos por cualquier dispositivo alimentado con energía eléctrica, como es el caso de muchos de nuestros aparatos domésticos modernos.

Existe una gran cantidad de estudios científicos que han evaluado la influencia de los CEM en los organismos. No obstante que en algunos de éstos no se ha observado respuesta alguna, un gran número de ellos muestra que la exposición a estos campos puede producir una gran variedad de efectos. Entre ellos se mencionan cambios en la tasa de proliferación celular, alteraciones en las propiedades de la superficie de las células, en la secreción de hormonas, etc. De gran importancia han sido también los estudios epidemiológicos, que han tratado de establecer una relación causal entre la exposición a estos campos y un incremento en algunos tipos de cáncer tanto en niños como en adultos. Hasta el momento los resultados obtenidos no han sido definitivos y a menudo han resultado controversiales, debido a numerosas críticas metodológicas; aunque no se duda que la radiación electromagnética pueda afectar la materia viviente, todavía no se cuantifica hasta donde puede ser causante de una patología específica.

Debido a la controversia que han arrojado los resultados sobre la posible relación entre los CEM y el potencial genotóxico o citotóxico, resulta por demás interesante la realización de experimentos en condiciones controladas que permitan determinar los efectos de estos campos a nivel citogenético, contribuyendo así a explicar algunos de los mecanismos por los cuales los CEM de 60 Hz pueden afectar la salud humana. En este estudio se presenta información concerniente al establecimiento y caracterización de los modelos físicos utilizados en la exposición de material biológico a CEM de 60 Hz *in vitro* e *in vivo* y se muestran resultados acerca del efecto producido por este factor físico en células de mamífero, evaluado mediante la utilización de técnicas citogenéticas y citológicas. Los modelos biológicos de este estudio

incluyeron: a) Prueba de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) en linfocitos humanos *in vitro*, b) Determinación de los parámetros hematológicos de ratón (*Mus musculus*, Línea BALB/c) expuestos *in vivo*, c) Prueba de Micronúcleos (cuerpos de Howell-Jolly) en médula ósea de ratón (*Mus musculus* Línea BALB/c) *in vivo* y d) Anális Citogenético de Células Germinales Reproductoras y Morfología Espermática en ratón (*Mus musculus* Línea CD-1) *in vivo*.

CAPITULO I

Diseño y Caracterización de los Modelos Físicos de Exposición de Sistemas Biológicos a Campos Electromagnéticos (CEM) de Frecuencia extremadamente baja (60 Hz).

ANTECEDENTES

Para llevar a cabo la presente investigación fue necesario construir y caracterizar los aparatos para exponer el material biológico de estudio a CEM. Si bien existen en el mercado algunos modelos físicos para exposición de tejidos, sobre todo humanos, a CEM, éstos no ofrecen garantías suficientes en cuanto a dosimetría y geometría de la exposición. En vista de que uno de los propósitos de esta investigación era trabajar en condiciones altamente controladas, fue indispensable entonces avocarse a esta tarea. En esta sección se presentan los resultados de dos modelos de exposición utilizados en este trabajo; uno *in vitro* para exposición de cultivos de linfocitos humanos y otro para exponer *in vivo* ratones de laboratorio a CEM sinusoidales de 60 Hz de frecuencia.

Física de los Campos Magnéticos

Si bien nuestro conocimiento de los fenómenos eléctricos es relativamente reciente, el hombre ha tenido noticia de los fenómenos magnéticos desde tiempos muy remotos. Así, Tales de Mileto (640-546 AC) hablaba de las atracciones magnéticas y los Chinos emplearon desde hace más de 2000 años la brújula magnética para la navegación y viajes en los desiertos de Mongolia. Este aparato se fundamenta en adoptar una orientación, la cual es ejercida por un campo magnético circundante (Wood, 1991).

La región en el espacio en la cual un objeto magnetizado puede a su vez magnetizar a otros cuerpos se llama **campo magnético**. La configuración de este campo puede obtenerse con el auxilio de una brújula o con limaduras de hierro, obteniéndose así las líneas de fuerza indicadoras de la presencia del campo magnético (Stewart, 1979).

Desde 1820 el Físico Danés Hans Oersted observó que una corriente eléctrica puede cambiar la orientación de la aguja de una brújula en forma semejante a como lo hace un imán. Este descubrimiento puso de manifiesto que en la vecindad de un conductor con corriente existe un campo magnético y, algo hasta entonces insospechado, que el movimiento de cargas eléctricas está relacionado con el origen de los campos magnéticos (Galar-Castelan, 1988).

Por otro lado, se dice que existe un **campo eléctrico** en un punto, si actúa una fuerza de origen eléctrico sobre un cuerpo estacionario cargado situado en dicho punto. Cualquier otra carga eléctrica colocada en un punto de ese campo eléctrico experimenta una fuerza producida por su interacción con la primera carga. La intensidad del campo eléctrico en esa zona es igual a la fuerza que el campo ejerce sobre unidad de carga eléctrica colocada en dicho sitio (Lin, 1994).

Desde otro punto de vista, el campo magnético se define como el espacio que rodea a un imán y en el que se ejerce una fuerza magnética. A las regiones donde parece concentrarse el magnetismo de los cuerpos magnéticos se les denomina polos magnéticos, los cuales son imposibles de aislar, ya que se encuentran siempre en parejas de signos opuestos. Si se rompe un imán en un intento por separar los polos, se encuentran otros nuevos formados en los extremos rotos. Si uno de estos pedazos se rompe, otra vez aparecen dos polos de clase opuesta. Tantas veces como se repita este proceso se tendrá el mismo resultado. No es posible entonces obtener un polo magnético aislado. De acuerdo a la Ley de Charles Coulomb los polos magnéticos de la misma naturaleza se repelen y los de naturaleza diferente se atraen (Parker, 1993).

Dirección. La dirección del campo magnético en un lugar se determina por la orientación que adopta un pequeño imán o brújula colocado en el lugar, en

el cual el polo Norte del imán tiende a orientarlo en dirección del campo y el polo Sur queda sometido a una fuerza que tiende a moverlo en la dirección opuesta. El resultado es que ambas fuerzas producen una resultante que hace girar al imán hasta que se orienta paralelamente a la dirección del campo, cuando las fuerzas sobre los polos son directamente opuestas y la resultante es cero. Los campos magnéticos se representan por líneas de fuerza que están dirigidas de los polos Norte a los polos Sur y que son tangentes a la dirección del campo en cada punto (Parker, 1993).

Los campos magnéticos no ejercen fuerzas sobre las cargas en reposo o moviéndose en dirección paralela al campo magnético, o sea una línea de fuerza. Sin embargo, si la carga se mueve en dirección perpendicular al campo, ésta describe un movimiento circular, o cuando pasa en dirección oblícua a un campo magnético, se produce una trayectoria espiral (ya que el movimiento paralelo al campo magnético no es afectado por éste). De esto se deduce que la fuerza magnética es perpendicular al plano determinado por la velocidad de la carga y el campo magnético, de acuerdo a la siguiente fórmula $F= qB\ (v\ sen\ \theta)$. La relación permite determinar B (campo magnético) si se conoce la fuerza, la velocidad y la carga y se mide en Teslas (T) en el Sistema Internacional de Unidades. (Newton.seg / Coulomb.metro o 1 Volt.seg/ m^2 o 1 Webar (Wb) / m^2), y es equivalente a 10^4 Gauss.

Por otro lado, el efecto del campo magnético sobre una corriente eléctrica se produce porque consiste de cargas en movimiento, y dado que $F=qvBSen\theta$ y que la carga recorre una longitud L en un tiempo Δt, entonces $v=L/\Delta t$, luego $F=qLBSen\theta/\Delta t$. Pero como q es la carga que ha pasado en el tiempo Δt por el conductor, la intensidad de la corriente $I=q/\Delta t$ y por lo tanto $F=ILBSen\theta$ (Rojo, 1981).

De lo anteriormente expuesto se deduce que el magnetismo se encuentra muy relacionado con la electricidad. Una carga eléctrica está rodeada de un campo eléctrico, y también de un campo magnético si se está moviendo. Esto se debe a las distorsiones que sufre el campo eléctrico al moverse la partícula. Einstein explicó este fenómeno con la teoría especial de la relatividad. Dicho de otra forma, las cargas en movimiento tienen asociados tanto un campo eléctrico como un campo magnético. El movimiento de la carga eléctrica produce un campo magnético. Curiosamente, puesto que el movimiento es relativo, también lo es el campo magnético, ya que si uno se mueve a la par de la carga de modo que no está en movimiento con respecto a nosotros no se detectará campo magnético alguno.(Hewitt, 1998)

Propiedades Magnéticas de la Materia

En un imán de barra el movimiento de cargas se dá porque éste está compuesto de átomos cuyos electrones se encuentran en movimiento constante alrededor del núcleo (movimiento orbital), esto constituye una minúscula corriente que genera un campo magnético, además giran en torno a su propio eje, lo cual asimismo constituye una carga en movimiento y por lo tanto genera otro campo magnético. Todos los electrones se comportan como imanes diminutos. Si dos electrones giran en el mismo sentido constituyen un imán más intenso. Pero si giran en sentido contrario, sus campos magnéticos se anulan mutuamente. Casi en todos los átomos los diversos campos se anulan uno con otro y por ello la mayoría de las sustancias no se comportan como magnetos, pero en materiales como el hierro, el níquel y el cobalto, estos campos no se anulan totalmente (Hewitt, 1998).

En función de la respuesta que los materiales presentan a un campo magnético se distinguen tres categorías: **diamagnéticos, paramagnéticos y**

ferromagnéticos, lo que será función del campo magnético que se genera en los átomos como consecuencia del movimiento de sus electrones. Las sustancias **diamagnéticas** al ser colocadas en un campo magnético se magnetizan en dirección contraria al campo; siendo esta magnetización unas mil veces menor que la de las sustancias paramagnéticas, aunque el efecto varía de una sustancia a otra. El diamagnetismo se debe a un efecto de distorsión de las órbitas electrónicas debido al campo magnético aplicado, lo que equivale a producir en cada átomo un **momento magnético** que tiene dirección opuesta a la del campo magnético, pero en una sustancia diamagnética sus átomos no poseen un **dipolo magnético neto** debido a que los momentos dipolares tanto los de orbitales como los de espín se cancelan. En consecuencia, una muestra macroscópica de estos materiales tampoco presenta un dipolo magnético; por lo que no es atraída por un magneto. En cambio, un material **paramagnético** presenta la propiedad de ser atraído por un magneto. Esto es consecuencia de que sus átomos o moléculas tienen momentos magnéticos permanentes que tienden a orientarse en la dirección de un campo magnético externo al que se exponen, convirtiéndose así en magnetos. Este magnetismo es suprimido al momento de eliminar el campo magnético externo. La orientación promedio de los dipolos magnéticos elementales depende de la intensidad del campo aplicado que tiende a alinearlos. Entre estos materiales se encuentran los radicales y compuestos de elementos de transición. Por otro lado, en los materiales **ferromagnéticos** se presenta un efecto paramagnético muy fuerte en el que estos se encuentran magnetizados en ausencia de un campo magnético externo. Esta magnetización natural indica que los momentos magnéticos de sus átomos o moléculas tienden a orientarse paralelamente como consecuencia de las interacciones entre ellos. Un análisis cuidadoso del fenómeno ha indicado que

los que tienden a alinearse son los espines de los electrones; el fenómeno ferromagnético es puramente cuántico, por lo que no es explicable por la física clásica. El resultado de exponer este tipo de materiales ante otro campo magnético externo es la formación de un nuevo campo que se suma al externo. (Pothakamury, et al., 1993).

Campo Magnético de la Tierra

El planeta tierra se comporta como si fuera un imán gigantesco cuyo norte magnético se encuentra cercano al polo Sur geográfico y el Sur magnético cercano al polo Norte geográfico, sin embargo para mantener la congruencia con la terminología usada en la literatura se prefiere llamar polo Norte magnético de la tierra al que se encuentra en las cercanías del polo Norte geográfico y polo Sur magnético al que se encuentra cercano al polo sur geográfico. El eje magnético de la tierra tiene una inclinación de aproximadamente 11.5° con respecto al eje de rotación de la tierra, y por lo tanto los polos magnéticos de la tierra no coinciden con los polos geográficos. Además, existe evidencia de que el eje magnético ha sufrido inversiones completas en su dirección hasta nueve veces en los últimos 4 millones de años. En general se considera que el campo geomagnético es originado por el movimiento de cargas eléctricas en torno al eje de rotación de la tierra, constituyendo así una corriente eléctrica neta en trayectoria circular y que estas corrientes están vinculadas al movimiento de convección de partículas portadoras de carga eléctrica debido al gradiente térmico del fluido nuclear y al arrastre de las mismas por el movimiento de rotación del globo terráqueo. También existen influencias externas, principalmente el viento solar que consiste principalmente de partículas de alta energía portadoras de carga eléctrica. El campo geomagnético se considera de tipo constante, es decir no

varía con el tiempo y por lo tanto tendría una frecuencia cercana a cero (Galar-Castelan, 1988).

Inducción Electromagnética

Faraday y Henry descubrieron que se podía generar corriente eléctrica en un alambre con el simple movimiento de meter y sacar un imán de una bobina, y que la producción de voltaje dependía del movimiento relativo del conductor y el campo magnético. La magnitud del voltaje inducido depende del ritmo al que el alambre corta las líneas del campo magnético, o bien que tan rápido cambia el campo magnético. El fenómeno se resume en el enunciado de la ley de Faraday: El voltaje inducido en una bobina es proporcional al producto del número de espiras y la razón de cambio del campo magnético dentro de dichas espiras. Por otra parte, la magnitud de la corriente depende de la resistencia de la bobina y del circuito al que está conectada. El fenómeno es similar al mencionado anteriormente en los efectos del campo magnético sobre una corriente eléctrica. Si la corriente fluye hacia la derecha, los electrones experimentan una fuerza perpendicular hacia arriba, como no hay trayectoria conductora por la que los electrones pueden fluir hacia arriba el alambre también experimenta una fuerza dirigida hacia arriba (efecto motor). Si desplazamos hacia abajo un alambre que inicialmente no transporta corriente, los electrones en su interior experimentan una fuerza deflectora perpendicular a su movimiento, aquí si hay trayectoria conductora en dicha dirección y los electrones la recorren, constituyéndose así una corriente, a esto último es a lo que se le ha llamado el "Efecto Generador" (Hewitt, 1998).

Inducción de Campos Eléctricos y Magnéticos (Campo Electromagnético)

Según el concepto moderno de la inducción electromagnética, lo que se induce son campos eléctricos y magnéticos que a su vez dan lugar a los voltajes que se han estado considerando. La inducción se efectúa haya o no cables conductores o medios materiales. La ley de Faraday en un sentido más general establece que: Se induce un campo eléctrico en toda región del espacio en la que exista un campo magnético que varíe con el tiempo. La magnitud del campo eléctrico inducido es proporcional a la rapidez con la que cambia el campo magnético. La dirección del campo eléctrico inducido es perpendicular al campo magnético variable. El efecto secundario complementario es el propuesto por James Clerk Maxwell en 1860, es decir, se induce un campo magnético en toda región del espacio en la que exista un campo eléctrico que varíe con el tiempo. La magnitud del campo magnético inducido es proporcional a la rapidez con la que cambia el campo eléctrico. La dirección del campo magnético inducido es perpendicular al campo eléctrico variable (Hewitt, 1998). Estos dos campos coexistentes se denominan **campo electromagnético** (Galar-Castelán, 1988).

Por otro lado, los campos electromagnéticos pueden clasificarse en homogéneos, heterogéneos estáticos y oscilantes. En un campo magnético homogéneo, la intensidad es uniforme en el área dentro de una bobina, mientras que en uno heterogéneo es variable; un campo magnético estático implica que la intensidad y dirección del campo son constantes en el tiempo, mientras que en un oscilante, varían la intensidad y dirección (Pothakamury, 1993).

Por otra parte, los dispositivos más empleados para generar CEM son los solenoides o bobinas, éstos consisten en un conjunto de espiras de alambre conductor que se disponen una a continuación de otra. Si se hace un corte *longitudinal del solenoide*, podemos ver la sección transversal del alambre que forma cada espira, tanto en la parte superior como inferior (Fig.I.1). Si se coloca un núcleo de un material ferromagnético se tiene un electroimán. En los puntos muy cercanos a una espira cualquiera del solenoide, el observador no puede determinar si el alambre está doblado en arco. Magnéticamente el alambre se comporta casi como si fuera un alambre recto y las líneas de campo magnético, debidas a una espira, son casi círculos concéntricos (Moreno-Trujillo, 1997).

Ondas Electromagnéticas

Cuando se agita de un lado a otro en el espacio una barra cargada se producen ondas electromagnéticas. Esto se debe a que la carga al moverse constituye una corriente eléctrica, y una corriente eléctrica siempre está rodeada de un campo magnético, como la corriente es variable, el campo magnético también es variable, el cual de acuerdo a la ley de Faraday produce un campo eléctrico variable, y el campo eléctrico variable de acuerdo a lo enunciado por Maxwell, induce a su vez un campo magnético variable. Una onda electromagnética se compone de campos eléctricos y magnéticos vibrantes que viajan juntos y no requieren medio alguno para ello. Los campos vibrantes emanan de la carga vibrante. En todo punto de la onda, el campo eléctrico es perpendicular al campo magnético y ambos son perpendiculares a la dirección de propagación de la onda. (Figura I.2). La magnitud de un campo inducido (el magnético y el eléctrico) depende de la razón de cambio de la vibración, pero también del movimiento del otro campo, es decir la rapidez

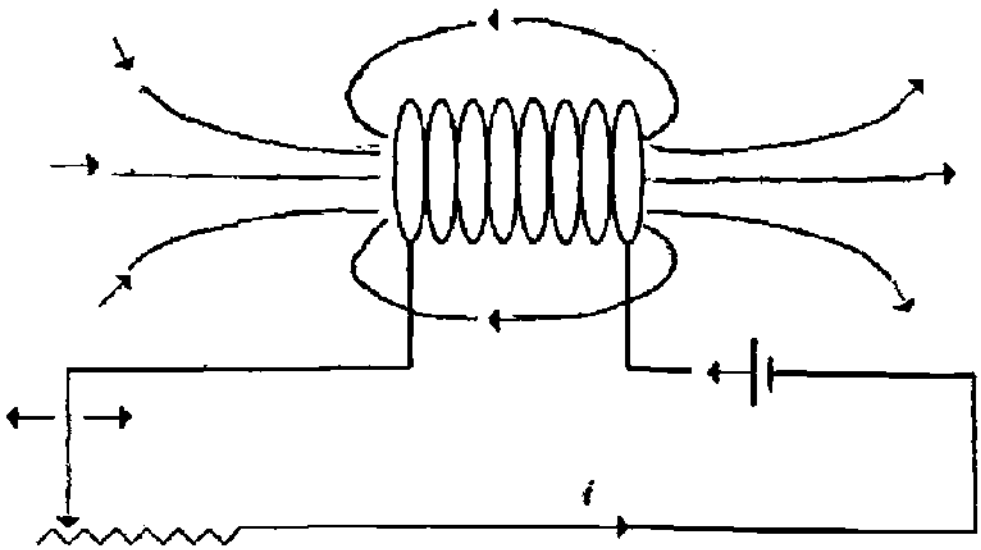

Figura I.1 Esquema que ilustra un solenoide de n espiras de alambre. Las flechas indican las líneas de fuerza del campo electromagnético generado por la corriente eléctrica que circula a través del alambre enrollado a manera de espiras.

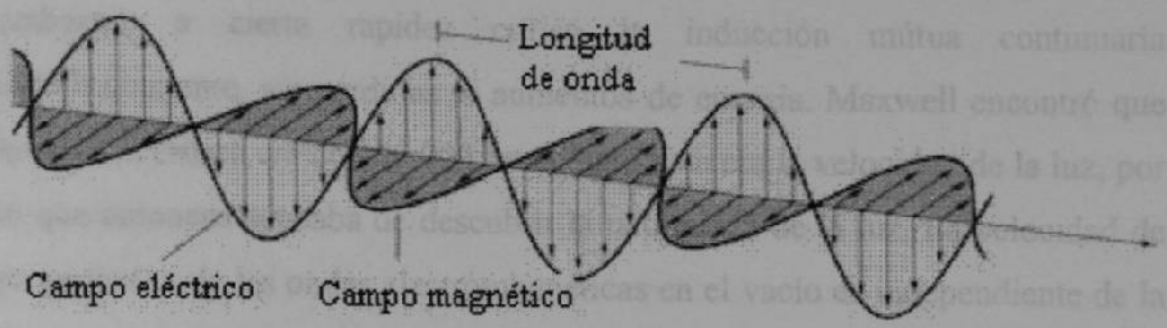

Figura I.2 Propagación de una onda electromagnética. Un campo eléctrico y otro magnético, perpendiculares uno del otro viajan en el espacio a la velocidad de la luz. La interacción de ambos campos se manifiesta como una sola entidad física que es llamada campo electromagnético.

con la que el otro campo emana la carga vibrante, si la rapidez fuese muy pequeña el campo inducido es débil por lo que la inducción mútua se atenuaría hasta anularse pero en este caso se habría destruido la energía, siendo incompatible con la ley de la conservación de la energía. Si la rapidez de emanación fuera muy elevada los campos inducidos aumentarían de magnitud sin cesar, otro caso incompatible con la conservación de la energía. Sin embargo, a cierta rapidez crítica la inducción mútua continuaría indefinidamente, sin pérdidas ni aumentos de energía. Maxwell encontró que la rapidez crítica era de 300,000 km/s, pero ésta era la velocidad de la luz, por lo que entonces acababa de descubrir la naturaleza de la luz. La velocidad de propagación de las ondas electromagnéticas en el vacío es independiente de la frecuencia y de la longitud de onda y el producto de la longitud de onda por la frecuencia es igual a la velocidad de la luz en el vacío (Hewitt, 1998).

Radiación Electromagnética y Espectro Electromagnético

En la naturaleza existen cargas oscilantes, de modo que hay muchas fuentes naturales de radiación electromagnética. La luz y la radiación térmica, por ejemplo son ondas electromagnéticas, que son el resultado de la oscilación de cargas eléctricas en los átomos del emisor. Desde el siglo antepasado se descubrió que la luz emitida por una flama de sodio sufría pequeñas variaciones cuando se le sometía al campo magnético de un imán. El físico H.A. Lorentz por su parte, demostró que las cargas eléctricas de los átomos de vapor de sodio, al estar sometidas a las fuerzas del campo magnético producían variaciones en la frecuencia de la luz emitida, las cuales eran explicadas por la teoría de Maxwell como oscilaciones de la carga del electrón. Estas fueron las primeras evidencias de la identidad entre la radiación electromagnética y la luz (Hewitt, 1998). Antes del siglo XIX las

ondas electromagnéticas estudiadas eran las que caían dentro del espectro visible o luz, es decir aquellas cuya longitud de onda está comprendida entre los 4 x 10^{-7} y 7.2 x 10^{-7} m, pero la teoría de Maxwell predice que pueden existir ondas electromagnéticas de cualquier longitud de onda o frecuencia. El espectro electromagnético, conocido y estudiado (Figura I.3), va desde los miles de kilómetros para las ondas de los campos magnéticos hasta los 10^{-16} m para los rayos gamma y los cósmicos (Parker, 1993).

La propagación de los campos electromagnéticos como un proceso ondulatorio explica satisfactoriamente muchos fenómenos importantes, pero falla en la explicación del intercambio de energía cuando la radiación electromagnética interacciona con la materia, pues solamente puede intercambiar cantidades discretas o cuantos de energía, lo que sugiere una estructura corpuscular de la radiación que Einstein llamó **fotón**. Actualmente se acepta que la radiación electromagnética tiene un comportamiento dual (Galar-Castelán, 1988). Esto es concebible, si se considera la sugerencia del físico francés De Broglie quien sugirió que la materia y las partículas (ya fueran fotones, electrones, átomos, balas y hasta seres humanos) tienen una longitud de onda relacionada con su momentum. La longitud de onda de una partícula de gran masa y poca rapidez es demasiado pequeña como para poder detectarse por medios convencionales, pero una partícula pequeña como un electrón que se desplaza con gran rapidez posee una longitud de onda detectable que es miles de veces menor que el de la longitud de onda de la luz visible (Hewitt, 1998).

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas (como aquellas de los circuitos domésticos de 50-60 Hz[1]) irradian muy poca energía ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e

1 Hz = Hertz, en el Sistema Internacional de Unidades 1 Hz es la unidad de Frecuencia y equivale a 1 ciclo / 1 seg.

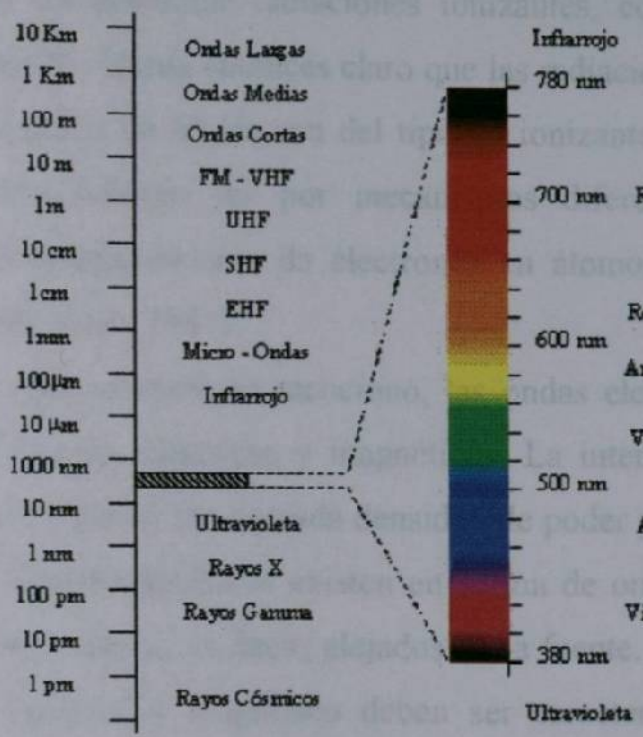

Figura I.3 El espectro electromagnético

Abarca desde las frecuencias extremadamente bajas de los campos magnéticos a las frecuencias muy altas de los Rayos gamma y cósmicos.

inversamente proporcional a su longitud de onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo, los rayos X y gamma. Queda entonces claro que las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que produzcan deberán ser por mecanismos diferentes a aquellos que involucran el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas blanco (Strother, 1980, Rojo, 1981).

Como anteriormente se mencionó, las ondas electromagnéticas son el producto de campos eléctricos y magnéticos. La intensidad de la radiación electromagnética puede ser llamada densidad de poder y se mide en watts/m^2. Los campos electromagnéticos existen en forma de ondas electromagnéticas solo en el campo lejano, es decir, alejados de la fuente. En el campo cercano, los campos eléctrico y magnético deben ser caracterizados como simples campos. El límite entre el campo lejano y el cercano es en la mayoría de los casos, su longitud de onda. En el caso de los campos de frecuencia extremadamente baja, donde la longitud de onda es de miles de kilómetros, los campos magnético y eléctrico son siempre evaluados separadamente. En los casos de frecuencias mayores como en las microondas, por otro lado, donde su longitud de onda es tan corta que la exposición humana ocurre en el campo lejano, no es necesario considerar los campos eléctrico y magnético por separado (Juutilainen y Lang, 1997).

Forma de la Onda: Describe el cambio, con el tiempo, de los campos magnéticos o eléctricos variables. La mayoría de las fuentes de los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (FEB), los de frecuencia muy baja (FMB) y de ondas de radio (RF) producen campos con

formas de onda sinusoidales, pero algunas fuentes emiten campos electromagnéticos con otras formas, como triangulares o rectangulares. Hay formas de onda con alto rango de cambio (en unidades de la intensidad del campo por unidad de tiempo) que inducen corrientes fuertes en tejidos y son biológicamente más activas que formas de onda con bajo rango de cambio (Juutilainen y Lang, 1997).

Modulación: Las radiofrecuencias son comúnmente moduladas por otra señal de más baja frecuencia para hacerla que lleve la información. Las formas más comunes de modulación son la amplitud modulada y la frecuencia modulada. La amplitud modulada puede ser importante en el efecto biológico de la radiación de radiofrecuencias. Muchos estudios *in vitro* señalan que las radiofrecuencias débiles, de amplitud modulada a frecuencias bajas, podrían tener efectos específicos similares a los efectos reportados por campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (De Seeza y Juutilainen, 1996; Postow y Swicord, 1996; Simunic, 1996).

La frecuencia que se maneja en este estudio es similar a la producida por la corriente eléctrica de los cables de tendido eléctrico, ésta varía como una onda sinusoidal con una frecuencia de 60 Hz. Los CEM generados por estas corrientes tienen esa misma frecuencia, y por tanto se encuentran en la región del espectro electromagnético denominado de frecuencia extremadamente baja, región comprendida entre los 3 y los 3 x 10^3 Hz (Muñoz, 1994).

Efectos Biológicos de los Campos Electromagnéticos

Debido a su composición electrolítica los seres vivos son por lo general buenos conductores de la electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas,

especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales debe estar asociado un campo magnético. Además, en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciables como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas y aquéllas en las que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un campo magnético externo depende tanto de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema como de las características del campo externo y de las propiedades del medio en el cual tiene lugar el fenómeno. Experimentalmente se ha probado que en los cambios que sufren algunos parámetros de los sistemas biológicos por la acción de los campos magnéticos influyen no solamente la intensidad, sino también las características espaciales y temporales de dicho campo. Dentro de este contexto, es diferente el efecto de un campo estático que solo produciría una rotación de los dipolos magnéticos, tendiendo a orientarlos en la dirección del campo y restringiendo su movilidad, ocasionando un efecto significativo si éstas participan en reacciones químicas, en contraste con uno que presenta variaciones periódicas con el tiempo y que pueden inducir movimientos oscilatorios sobrepuestos a la oscilación en los dipolos magnéticos moleculares, lo que de alguna manera podría afectar la velocidad de las reacciones químicas dependiendo de la amplitud, frecuencia y sentido de las variaciones del campo magnético. En la literatura científica un gran número de trabajos prueban el efecto de los campos magnéticos sobre reacciones enzimáticas *in vitro*, dando efectos cualitativa y cuantitativamente diferentes dependiendo de la reacción que se trate y de las características del campo. Por otra parte, en los seres vivos al desplazarse en el seno de un campo magnético como el terrestre o uno artificial se induce una diferencia de potencial. Aunque el campo geomagnético es relativamente débil, estos efectos han sido observados en elasmobranquios. Se sabe que los tiburones y

rayas poseen mecanismos basados en la inducción electromagnética para orientarse y localizar a sus presas y que la intensidad del campo magnético puede ser un factor limitante en la capacidad de respuesta del sujeto. También se ha propuesto que las aves migratorias poseen un mecanismo de orientación para la navegación basado en la generación de potenciales eléctricos inducidos electromagnéticamente. Igualmente, se ha encontrado que algunos microorganismos, particularmente bacterias, tienen la propiedad de orientar su movimiento en respuesta a un campo magnético externo (magnetotactismo), estas bacterias contienen una o dos cadenas intracelulares ricas en partículas de fierro. Asimismo se han descrito propiedades de magnetosensibilidad para una gran diversidad de insectos migratorios y aún en el ser humano, aunque en éste último el hallazgo es controversial (Lin. 1994).

Las ondas de radio y algunos tipos de luz ultravioleta, son algunas radiaciones no ionizantes a las que el hombre está frecuentemente expuesto. Los efectos biológicos de las primeras están siendo determinados en la actualidad, mientras que el daño que produce la luz ultravioleta en el ADN se ha relacionado con la formación de dímeros de timina, que es la lesión más frecuentemente inducida por esta radiación, por lo general estos daños son eliminados por las células a través de mecanismos de reparación por escisión. Si las células expuestas no son eficientes en este tipo de reparación, el daño al ADN permanecerá y la célula sufrirá alteraciones considerables como en el caso del *Xeroderma pigmentosum* y del cáncer en la piel (Brusik, 1987).

Por otro lado, radiaciones no ionizantes de frecuencia extremadamente baja como es el caso de los campos magnéticos de 60 Hz han mostrado tener efectos sobre los sistemas biológicos y se ha informado que éstos pueden afectar la velocidad de las reacciones y una gran cantidad de procesos bioquímicos (Galar-Castelan, 1988).

Asimismo, se ha informado que los CEM tienen efectos sobre la síntesis de ADN, ARN y proteínas, cambios en la producción de hormonas; modificación de la respuesta inmune y en el grado de crecimiento y diferenciación celular (Tenforde, 1991).

Adicionalmente se han obtenido evidencias experimentales que sugieren que los CEM afectan el crecimiento celular en varios tipos de células (Cantini et al., 1987; Goodman et al., 1983; Liboff et al., 1984; McLeod et al., 1987; Rodan et al., 1978; Takahashi et al., 1987; Yen-Patton et al., 1988).

Desde el punto de vista físico, se ha demostrado que es el campo eléctrico inducido por el campo magnético variable el que determina la respuesta celular. Sin embargo, la influencia de un campo magnético estático añadida al campo variable, también ha quedado demostrada, por lo que el mecanismo de interacción es más complejo que la sola influencia de campos eléctricos inducidos. Se supone que la interacción principal ocurre en la membrana celular y más específicamente en los canales iónicos, siendo los del calcio los que participan más activamente en las alteraciones biológicas (Lin, 1994).

Se ha evaluado también el efecto de los campos eléctricos en embriones. En un estudio, se expusieron ratones C3H/He machos, a un campo eléctrico de 20 kV/m de 50 Hz de frecuencia por dos semanas. Después, cada ratón macho fue apareado con 2 hembras diferentes cada semana durante un período de 8 semanas para que las hembras fueran fecundadas por los ratones que habían sido expuestos al campo eléctrico y no se encontraron alteraciones en la sobrevivencia de los embriones (Kowalczuk et al., 1990).

En otro estudio Nordstrom et al. (1983) encontraron un incremento en la frecuencia de malformaciones congénitas en niños cuyos padres trabajaban en

fuentes generadoras de alta tensión, lo cual podría indicar, efecto a nivel genético de los CEM.

Por otra parte, es bien sabido que los CEM de baja frecuencia pueden producir una variedad de efectos benéficos en los sistemas biológicos. Los campos magnéticos pulsantes por ejemplo, son usados para la reparación de fracturas óseas, Andrew y Basset (1989), mostraron que el tejido óseo es sensible a campos magnéticos y eléctricos de baja frecuencia. Primero se sometió al tejido a un campo magnético variable de baja frecuencia y se detectó que en el tejido se inducía una corriente, ya que la lectura del voltímetro se modificaba en presencia de dicho campo. De este modo se inicio el estudio de la posible utilización de campos magnéticos para la terapia de fracturas persistentes y en algunos casos, de osteoporosis.

Campos Electromagnéticos y Cáncer

Recientemente se ha discutido la posible relación de la exposición a CEM con el desarrollo de leucemia aguda y se ha propuesto una relación entre la forma de exposición al campo magnético en niños y adultos, sin embargo, no se han definido bien a los CEM como causantes de la enfermedad (Blank, 1995).

Asimismo, en varios estudios epidemiológicos se ha correlacionado la exposición de seres humanos a campos electromagnéticos con una alta incidencia de cáncer (Coleman et al., 1983; McDowall, 1983; Milham, 1982; Pearce et al., 1985; Tomenius et al., 1982; Wertheimer and Leeper, 1979; Wrigth et al., 1982).

En contraste, Costa y Hoffmann (1987), descubrieron que campos magnéticos de alta intensidad, en el intervalo 1 a 50 T, con una frecuencia de 5 a 1000 KHz, reducen la concentración de células malignas en tejido animal.

Por lo general para el tratamiento del cáncer, el tejido enfermo se somete de 1 a 1000 pulsos de 100 μseg a un segundo de duración dependiendo del tipo de tumor. El efecto de este tratamiento es la reducción en el número de células malignas; después se aplica la quimioterapia. La ventaja es que no se genera calor en el tejido y aunque el tejido normal también sufre alteración, el cambio es menor comparado con el efecto que tiene en las células cancerosas. En adición, las células del sistema inmunológico no se afectan con el tratamiento por lo que el efecto neto en el organismo es favorable.

Por otro lado, se han postulado teorías acerca de la posibilidad de carcinogénesis asociada con los CEM. Así, Fitzgerald (1990), propone un mecanismo para explicar la formación de un tumor debido a esta causa en el cual, se tienen al menos dos etapas: 1) Etapa de iniciación, en la cual el ADN es dañado por un agente externo, produciendo ADN anormal y dando lugar a la expresión de proteínas anormales. Para la iniciación se requiere suficiente energía para romper los enlaces químicos del ADN (más de la que pueden proporcionar los CEM a los cuales estamos habitualmente expuestos). 2) Etapa de promoción, que es el período de latencia entre la exposición a un carcinógeno y la manifestación de cáncer. De acuerdo a lo anterior los CEM actuarían más bien como promotores que como iniciadores, ya que acelerarían el proceso de desarrollo de cáncer más que inducirlo directamente.

En un estudio experimental Loescher et al. (1993), indujeron tumores mamarios en ratas utilizando el 7, 12 dimetilbenzantraceno (DMBA) a un grupo de 99 ratas hembras para luego exponer a campos magnéticos de 100 μT por 24 horas diarias durante 7 días; otro grupo de 99 ratas fue utilizado como testigo bajo las mismas condiciones ambientales que el grupo expuesto al tratamiento. Los resultados indicaron que las ratas tratadas con DMBA y expuestas por un largo período al campo magnético, manifestaron un

crecimiento e incidencia de tumores mamarios malignos mayor que el del grupo no expuesto al campo magnético.

Por su parte, Perry (1994), encontró que cuando se expusieron cultivos de células cancerosas a campos magnéticos, se presentaba un aceleramiento significativo en el crecimiento celular, el cual continuaba a una tasa rápida aún después de la exposición al campo magnético. Asimismo, en ratas en las que se indujo la formación de tumores mamarios químicamente, se encontró que presentaban un grado mayor de crecimiento de tumor cuando se exponían a campos magnéticos de baja frecuencia.

Por otro lado, se ha sugerido que el riesgo de leucemia infantil puede estar relacionado con los efectos combinados de campos magnéticos estáticos y de campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja. También se han realizado estudios epidemiológicos que han demostrado el incremento del riesgo a padecer leucemia en niños que viven cerca de líneas de distribución eléctrica (Blank, 1995; Bowman et al., 1995). También Antonopoulos et al. (1995), han sugerido que los CEM tienen relación con el cáncer, para esto, ellos incubaron cultivos de sangre periférica en presencia de un CEM de 5 mT y 50 Hz de frecuencia. Los resultados obtenidos indicaron que los efectos carcinogénicos originados por CEM no son de tipo iniciador, pero probablemente tengan efectos promotores.

Modelos Físicos de Exposición a Campos Magnéticos

En el estudio de los efectos biológicos de los CEM, se emplean una diversidad de aparatos de exposición, los cuales varían en estructura y características.

Como ya se mencionó anteriormente (Figura I.1), el dispositivo más común es el solenoide, sin embargo existen otros como los toroides o las

bobinas Helmholtz que también suelen utilizarse en una diversidad de trabajos que investigan efectos de los CEM en sistemas biológicos (Lin, 1994). En la Figura I.4 se ilustra un toroide y el sistema de bobinas Helmholtz comparándose con el ya mencionado solenoide

En lo que concierne al toroide, éste consiste básicamente en un solenoide circularizado, es decir enrrollado en forma de rosquilla, el material biológico a exponerse suele colocarse en el centro del círculo donde se homogeniza el campo magnético. Sin embargo, la desventaja de este sistema es que, en contraste con el solenoide, el CEM generado, no es constante en toda la sección transversal del toroide y por lo tanto se deben hacer cálculos cuidadosos que consideren una minuciosa geometría de la exposición (Leonard et al., 1990; Yasui y Okada, 1993).

En lo que respecta a las bobinas tipo Helmholtz, éstas consisten en un par de bobinas planas circulares con igual número de vueltas y de diámetros iguales dispuestas en un eje imaginario común y conectadas en serie para así tener una misma corriente. El propósito de este arreglo es para obtener un campo magnético que sea más uniforme que el de una bobina simple, como es el caso del solenoide y sin la necesidad de usar una bobina muy larga (solenoide simple) en la que sí se lograría obtener un campo uniforme. El arreglo optimo en un sistema de bobinas Helmholtz es aquel donde la distancia entre las dos bobinas es igual al radio de una de ellas, en este caso, la variación en la intensidad del campo cerca del centro del sistema es mínimo y asimismo presenta uniformidad. La intensidad del campo es la suma de los campos producidos por las bobinas individuales (Parker, 1993).

Para el presente trabajo, se prefirió la utilización de solenoides que debidamente caracterizados y cuidadosamente construídos son aceptados

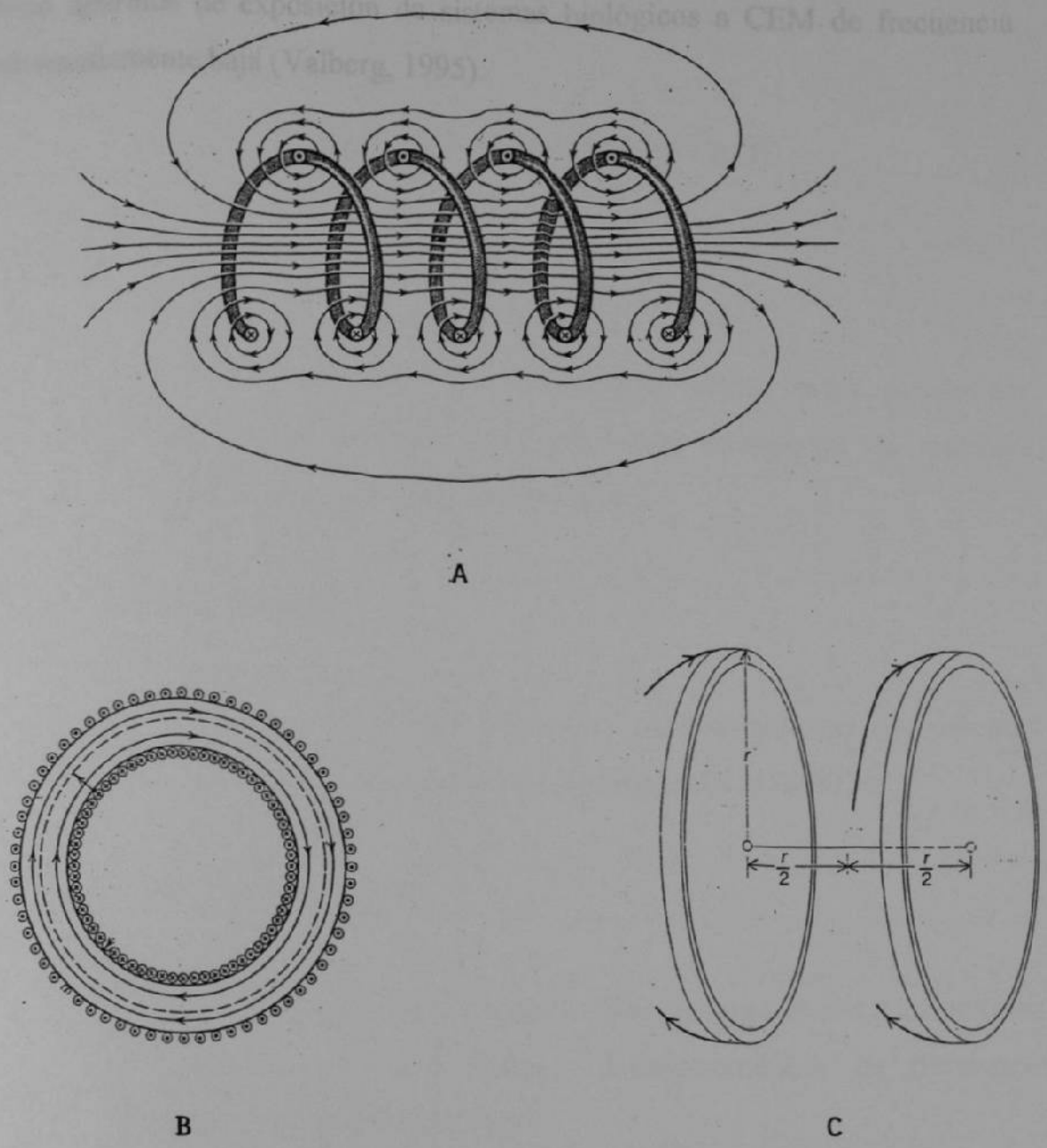

Figura I.4 Dispositivos para generar campos electromagnéticos (A) Solenoide, (B) Toroide y (C) Sistema dual de bobinas Helmholtz

como aparatos de exposición de sistemas biológicos a CEM de frecuencia extremadamente baja (Valberg, 1995).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Es posible construir solenoides, que debidamente caracterizados, puedan ser utilizados como modelos físicos confiables para exposición de sistemas biológicos a campos electromagnéticos de 60 Hz.

OBJETIVO GENERAL

Establecer modelos físicos, tipo solenoide, para exposición de sistemas biológicos (*in vitro* e *in vivo*) a campos electromagnéticos de 60 Hz.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

A) Diseñar y caracterizar un modelo físico de exposición para cultivos celulares (*in vitro*) a campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (60 Hz).

B) Diseñar y caracterizar un modelo físico de exposición para ratones de laboratorio (*in vivo*) a campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (60 Hz).

MATERIAL Y METODO

I.- Sistema de Exposición *in vitro*

Este modelo se implementó para llevar a cabo la exposición de cultivos de linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica. Para tal efecto se construyó un solenoide o bobina generadora del CEM, el cual estaba formado por un devanado de 340 vueltas de alambre de cobre calibre No.16 enrollado alrededor de un tubo de PVC, el cual tuvo una altura de 25 cm, un radio de 5.27 cm y una resistencia de salida de 1.9 ohms. El solenoide se conectó a un transformador-reductor, con una alimentación de entrada de 127 V $\pm$ 10% y una salida de 12 V, éste a su vez se unió a un transformador variable que tuvo un máximo de 140 V y 7.5 Amp de salida con una alimentación de 120 V y una frecuencia de 60 Hz. En la Figura I.5 se presenta el diagrama general de este sistema de exposición. El solenoide que contenía los frascos de cultivo se colocó en el interior de una incubadora que tuvo una temperatura constante de 36.5°C $\pm$ 0.1°C. En el presente estudio se utilizaron tres intensidades magnéticas (1.0, 1.5 y 2.0 mT) de onda sinusoidal de 60 Hz de frecuencia, esto fue constatado monitoreando el sistema con un osciloscopio (marca BK-Precision 5120). En el mismo sistema de incubación de los cultivos y en forma simultánea, se colocaron los cultivos testigo en una área en la cual no recibieron la influencia del CEM. En la Figura I.6 se muestra una vista frontal de esta disposición. Por otro lado, en la Figura I.7 se presenta otro diagrama que ilustra la forma en que fueron colocados los cultivos a exponerse al CEM y la de los grupos no expuestos, en donde se puede apreciar otro aspecto de la disposición entre ellos. Cabe mencionar que se consideró estrictamente la geometría de la exposición y para ello los cultivos expuestos fueron colocados

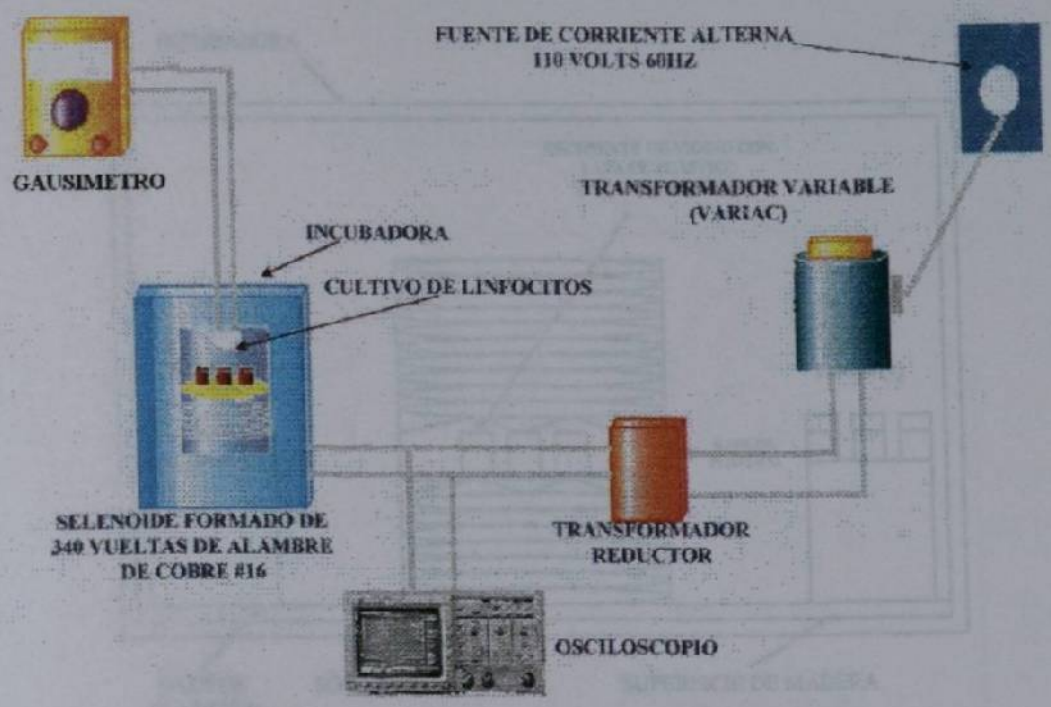

Figura I.5 Diagrama general del sistema de exposición utilizado para el tratamiento magnético *in vitro* de cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica

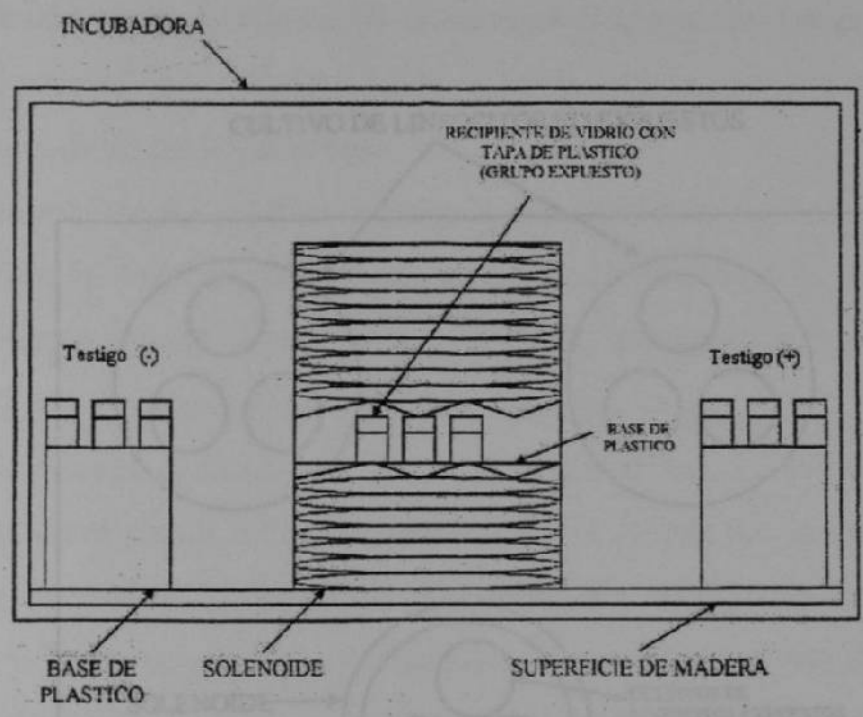

Figura I.6 Representación esquemática que ilustra una vista frontal de la exposición de cultivos de linfocitos a CEM oscilantes de 60 Hz. Se indican además los testigos que fueron colocados dentro de la misma incubadora, en sitios predeterminados donde no se detectó campo magnético.

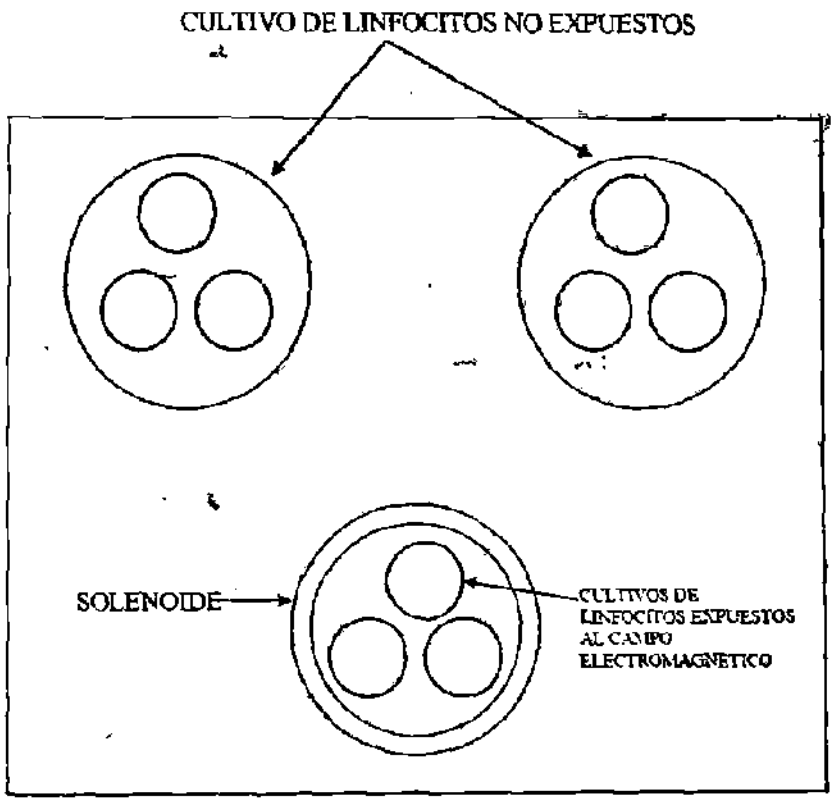

Figura I.7 Diagrama que ilustra una vista superior de la forma en que fueron dispuestos los cultivos de linfocitos. Los que se expusieron al CEM de 60 Hz y los testigos. Los tres juegos de tres cultivos se ubicaron a una distancia máxima de 10 cm entre cada uno.

sobre una base de acrílico que tenía círculos concéntricos marcados para cuidar así que la distancia del cultivo del centro a la periferia del solenoide fuera la misma, ya que se sabe que el campo eléctrico inducido por el CEM es dependiente del radio en el cual se encuentra la muestra.

Por otra parte, la Figura I.8 muestra el diagrama de los componentes eléctricos para generar y medir el CEM utilizado en la exposición *in vitro*.

II.- Sistema de Exposición *in vivo*.

Con este modelo se llevó a cabo la exposición de ratones *in vivo* para llevar a cabo la determinación de los parámetros hematológicos, la prueba de micronúcleos y el análisis citogenético de células espermatogénicas (capítulos III, IV y V respectivamente) de ésta tesis investigación.

Los ratones utilizados en los experimentos fueron colocados en el interior de un solenoide, el cual constaba de 552 vueltas de alambre de cobre laqueado, de calibre 14, enrollado en una matriz de plástico de 27 cm de diámetro y 71 cm de alto. Este fue alimentado por una corriente eléctrica que provenía de una fuente de corriente alterna de 60 Hz a la cual se conectó a un transformador variable CONTROVAC-AC modelo A8.cp. con una entrada de 120 volts y 12 amperes. Todo esto se hizo pasar a su vez por un transformador reductor que permitió manejar el amperaje requerido para producir la intensidad magnética deseada (1.0, 1.5 y 2.0 mT). A excepción del solenoide, los componentes de este sistema fueron similares a los presentados en la Figura I.5 para el caso de la exposición *in vitro* de linfocitos, anteriormente descrito. Asimismo, el diagrama de componentes eléctricos para este sistema, es similar al anteriormente descrito (*in vitro*), en la Figura I.8

También en este caso, con objeto de establecer la geometría de la exposición, se construyeron separadores plásticos de PVC y acrílico que permitieron exponer tres ratones simultáneamente en posiciones

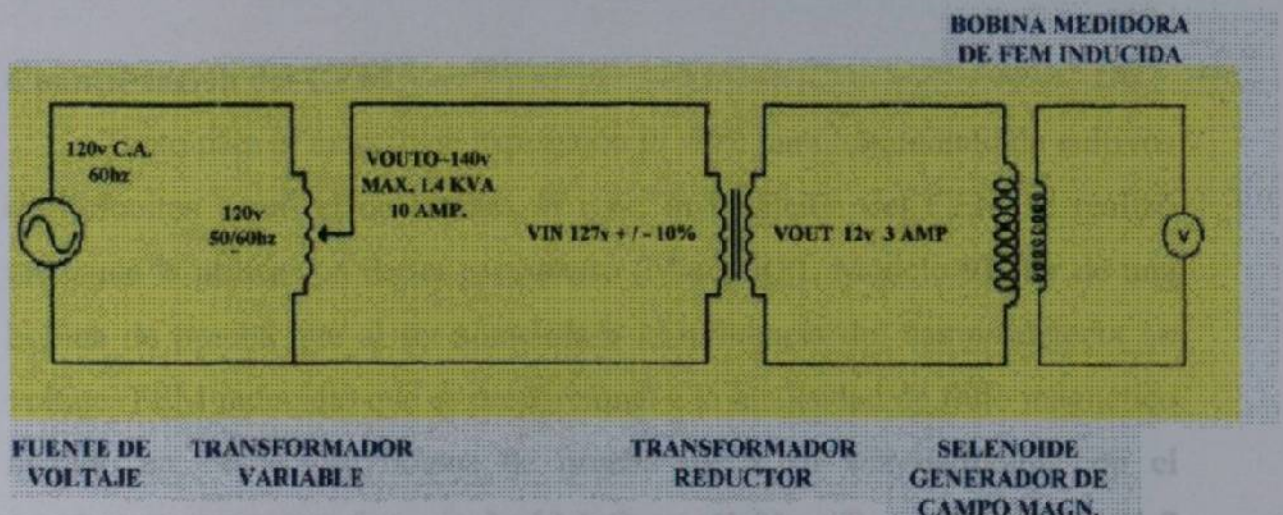

Figura I.8.- Diagrama de componentes eléctricos para generar y medir el CEM de 60 Hz empleado para exposición de material biológico *in vitro* e *in vivo*.

predeterminadas donde el pico máximo de medición indicó el valor de densidad de flujo magnético deseada. Asimismo se colocaron alimentadores acrílicos y botellas con agua para el suministro de los animales durante el tiempo que duró el experimento. En la Figura I.9 se muestra una fotografía en donde se aprecia una vista superior del solenoide que contenía a los tres ratones durante el tratamiento magnético.

Cuantificación del CEM

Tanto para el modelo de exposición *in vitro* para tratamiento de cultivos de linfocitos como el de ratones *in vivo*, la medición del CEM se realizó mediante la utilización de un gausímetro (Marca RFL Modelo 912) y de una bobina de prueba que al ser sometida a la influencia del campo detecta un voltaje (FEM inducida) que es proporcional a la intensidad de flujo magnético medido en Teslas. La bobina de prueba fue a su vez calibrada con el gausímetro con una referencia de 10.1 Gauss (1.01 mT) que fue igual a 1.7 mV de corriente alterna detectados en esta bobina. Dicha bobina de prueba se construyó enredando en un tubo de plástico de 6.8 mm de diámetro, alambre de cobre laqueado del No.32, un total de 50 vueltas. Se constató asimismo con la Bobina de prueba que el CEM era homogéneo dentro del solenoide donde se expusieron los cultivos de linfocitos o en la zona en que se colocaron los ratones.

Figura I.9 Fotografía que ilustra una vista superior del solenoide utilizado para exposición *in vivo* a CEM de 60 Hz. Se aprecian los tres compartimentos equidistantes donde se colocan los animales para ser sometidos al tratamiento magnético.

Criterios para Caracterización del CEM

En ambos sistemas de exposición antes descritos, se hizo la caracterización física requerida para que hubiera reproducibilidad en los resultados, dicha caracterización de acuerdo a Cadossi et al. (1992), debía incluir, la frecuencia, amplitud y forma de la onda así como la geometría de la exposición. Con respecto a ésta ultima, se tomó en cuenta que el campo eléctrico inducido por el CEM en el sistema a exponer, es proporcional al radio con respecto al centro de la bobina (Liburdy, 1993), por esta razón se colocó un anillo acrílico concéntrico que permitía exponer las células y los animales siempre en la misma posición. Esto es de gran importancia si consideramos que el efecto biológico de un CEM está directamente relacionado con ese campo eléctrico inducido en las células (Leonard y cols. 1990). Para llevar a cabo la caracterización física de los modelos se utilizó además un osciloscopio de 2 canales marca BK modelo 2120 No. de serie 201-01787.

RESULTADOS

En la Tabla I.1, se muestran los valores obtenidos en las mediciones eléctricas y magnéticas realizadas al sistema de exposición *in vitro* utilizado para la exposición de cultivos de linfocitos humanos, cada valor representa el promedio de 10 mediciones. Se comprobó que el sistema fue capaz de generar un campo electromagnético alternante u oscilante con una frecuencia de 60 Hz que es la que se encuentra comunmente en las tomas de corriente alterna en el continente americano. Como puede observarse los valores presentaron una mínima dispersión y se mostraron bastante regulares a lo largo de las mediciones realizadas.

Cabe mencionar que durante todo el tiempo en que los cultivos o animales fueron tratados con el campo magnético, la bobina de prueba permaneció en el interior de los solenoides para constatar la fidelidad en la intensidad del CEM.

Por otra parte la Tabla I.2, presenta asimismo estas variables eléctricas y magnéticas pero en este caso para el sistema de exposición de ratones *in vivo*, en el cual también se comprobó la generación de un CEM oscilante de 60 Hz el cual fue homogéneo en la zona de exposición, al centro de la bobina. Para este caso se observó asimismo una mínima variación en los datos obtenidos producto de 10 mediciones consecutivas aplicadas al sistema.

B (mT)	Vrms FEM Inducida en mV AC $\bar{x} \pm DS$	V Alimentado al Solenoide $\bar{x} \pm DS$	Tipo de Onda	Amplitud de Onda (V) $\bar{x} \pm DS$	Frecuencia Hz
1.0	1.08 ± 0.001	0.78 ± 0.003	Sinusoidal	4.65 ± 0.002	60
1.5	2.52 ± 0-001	1.15 ± 0.001	Sinusoidal	6.90 ± 0.001	60
2.0	3.36 ± 0.002	1.34 ± 0.002	Sinusoidal	9.30 ± 0.002	60

Tabla I.1 Mediciones eléctricas y magnéticas obtenidas del sistema de exposición *in vitro* para ser utilizado con cultivos de linfocitos humanos, donde *B* = campo electromagnético en miliTeslas, Vrms = raíz cuadrada media del Voltaje, detectado en la bobina de prueba, V = Volts, AC = Corriente Alterna, Hz = Hertz, que es la unidad de frecuencia de una onda en el Sistema Internacional de Unidades. El valor de la amplitud de onda fue registrado con ayuda del osciloscopio.

$

B (mT)	Vrms FEM Inducida en mV AC $\bar{x} \pm DS$	V Alimentado al Solenoide $\bar{x} \pm DS$	Tipo de Onda	Amplitud de Onda (V) $\bar{x} \pm DS$	Frecuencia Hz
1.0	1.08 ± 0.001	4.0 ± 0.001	Sinusoidal	7.21 ± 0.002	60
1.5	$2.52 \pm 0\text{-}001$	7.8 ± 0.001	Sinusoidal	9.34 ± 0.001	60
2.0	3.36 ± 0.002	14.0 ± 0.002	Sinusoidal	11.78 ± 0.002	60

Tabla I.2 Mediciones eléctricas y magnéticas obtenidas del sistema de exposición *in vivo* para utilizarse con pequeños mamíferos (ratones), donde *B* = campo electromagnético en miliTeslas, Vrms = raíz cuadrada media del Voltaje, detectado en la bobina de prueba, V = Volts, AC = Corriente Alterna, Hz = Hertz, que es la unidad de frecuencia de una onda en el Sistema Internacional de Unidades. El valor de la amplitud de onda fue registrado con ayuda del osciloscopio.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados de la caracterización física de los sistemas de exposición empleados en este trabajo se puede asumir que se utilizaron sistemas físicamente confiables para llevar a cabo los experimentos propuestos. Básicamente se consideraron los criterios internacionalmente recomendados para sistemas de exposición a campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja previamente recomendados (Cadossi et al., 1992; Valberg, 1995).

Si bien es cierto que existen desde hace tiempo en el mercado bobinas comerciales y sistemas de exposición que son utilizados por diversos investigadores, como es el caso de las bobinas Helmholtz (McLeod et al., 1983), otros investigadores recomiendan la construcción de sistemas propios que debidamente caracterizados son capaces de brindar exposiciones confiables.

El sistema que más problemas presentó en este trabajo fue el de exposición *in vivo* con el cual se pretendía exponer animales en forma aguda por 72 horas continuas y por 10 días durante 8 horas diarias. Sin embargo se mantuvo una adecuada higiene y el consumo de alimento y agua fueron adecuados durante el período de tratamiento magnético. El modelo físico de exposición aquí presentado, cumplió con las expectativas y es más simple que otros como aquel de Yasui y Otaka (1993), aunque con éste último se pueden exponer una mayor cantidad de animales por experimento.

Una de las críticas más frecuentes a las investigaciones acerca del efecto biológico de campos magnéticos, es la falta de reproducibilidad de los resultados, atribuible en la mayoría de los casos, a la falta de estandarización de los modelos de exposición (Pilla, 1993). La ventaja de la utilización de solenoides, como el de este estudio, es que son modelos muy simples, fáciles

de reproducir, aunado a lo económico y que, adecuadamente caracterizados, brindan exposiciones magnéticas confiables y con variaciones mínimas.

CONCLUSION

Se logró la construcción y caracterización física de dos sistemas de exposición a CEM oscilantes de 60 Hz, *in vitro* e *in vivo* los cuales cumplen con las características requeridas a nivel internacional, para el estudio del efecto biológico de campos magnéticos.

t

LITERATURA CITADA

Andrew C. y Basset L.(1989). Aspectos prácticos y fundamentos de usos terapéuticos de campos electromagneticos pulsados. Revista de Ingeniería Biomédica, 5: 451-529.

Antonopoulos A., Yang B.C., Estamm A., Heller WD., Obe G. (1995). Cytological Effects of 50 Hz Electromagnetic Fields on Human Limphocytes *in vitro*. Mutat. Res. Letters. 346: 157.

Blank M. (1995). Biological effects of enviromental electromagnetics fields : Molecular mechanism. Biosystems. 35:175-178.

Bowman J.D., Thomas D.C., London S.J., Peters J.M. (1995). Hipothesis: The risk of childhood leukemia is related to combinations of power-frecuency and statics magnetic fields. Bioelectromagnetics. 16: 48-59.

Brusik D. (1987). Principles of genetic toxicology. New York. Plenum Press. 1st Edition. pp 53-76.

Cadossi R., Bersani F., Cossarizza A., Zucchini P., Emilia G., Torelli G. and Franceschi C. (1992). Lymphocytes and Low-Frequency Electromagnetic Fields. The Faseb Journal. 6: 2667-2674.

Cantini M., Cossarizza A., Bersani F., Cadossi R., Cecherelli G., Tenconi R., Gatt C. and Franceschi C. (1987). Enhancing effects of pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation. J. Bioelectric.5: 91-104.

Coleman M., Bell J. and Skeet R. (1983). Leukemia incidence in electrical workers. Lancet. 982-983.

Costa J.L. and Hoffmann G.A. (1987). Malignicy treatment. US Patent No.65898.

De Seeza, R. and Juutilainen J. (1996). Biological effects relevant to amplitud modulated radiofrequency fields, in: Simunic D (Ed), COST 244 Position Papers. COST 244: Biomedical Effects of Electromagnetic Fields, *CEC-XIII-PP01/96*, European Union.

Fitzgerald K. (1990). Electromagnetic fields: the jury's still out. IEEE Spectrum. August. 800: 22-35.

Galar-Castelan I. (1988). Electricidad y magnetismo para Estudiantes de Ciencias Biológicas. Editorial Limusa.1ª. Edición. Mex., pp. 223-237.

Goodman R., Bassett C.A.L. and Henderson A.S. (1983). Pulsing electromagnetic Fields induce cellular transcription. Science. 220: 1283-1285.

Hewitt. (1998). Física Conceptual. Addison Wesley Longman (Editorial). Séptima reimpresión. pp. 616-629.

Juutilainen J. and Lang S. (1997). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. Mutat. Res. 387: 165-171.

Kowalczuk CI., Robbins L., Thomas J.M., Saunders R.D. (1996). Dominant lethal studies in male mice after exposure to 50 Hz magnetic field. Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 328: 2 pp. 229-237.

Leonard A., Neutre R., Yust M. and Lee G. (1990). Electromagnetic and Magnetic Fields. Measures and Possible Effects on Human Health. Health Service Department. Cal. U.S.A. p 13.

Liboff A.R., Williams T., Strong D.M., and Wistar R. (1984). Time-varing magneticfields: effects on DNA synthesis. Science. 223: 818-820.

Liburdy R.P. (1993). Biological Interactions of Cellular Systems with Time-Varying Magnetic Fields. Ann. N.Y. Acad. of Sci.III: 74-95.

Lin J.C. (1994). Advances in electromagnetic fields in living systems. Volume 1. First Edition. Plenum Press. N.Y. pp. 18-20.

Loescher W., Mevissen M., Lehmacher W. and Stamm A. (1993). Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field. Cancer letters 71:75-81.

McDowall M.E. (1983). Leukemia mortality in electrical workers in England and Wales. Lancet. 16: 243.

Mc Leod K., Lee R. and Erlich. (1987). Frequency dependence of electric fields modulation of fibroblast protein synthesis. Science. 236:1465-1469.

Mc Leod B.R., Pilla A.A., Sampsel M.N. (1983). Electromagnetic Fields Induced by Helmholtz Aiding Coils Inside Saline-Filled Boundaries. Bioelectromagnetics 4: 357-370.

Milham S. (1982). Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. New Engl. J. Med. 307: 249.

Moreno-Trujillo O.A. (1997). Diseño de un equipo de Tesla modulado en baja frecuencia para el tratamiento experimental de la osteoporosis aplicable al laboratorio de fisiología de la escuela médico militar. Universidad del ejército y fuerza aérea escuela militar de ingenieros. Tesis inédita. pp 33-45.

Muñoz R. (1994). Estudios jurídicos sobre la regulación y reglamentación que existe en materia de riesgos, derivados de problemas que se producen en los campos electromagnéticos y sobre el reconocimiento en la legislación del peligro potencial de daño que existe en instalaciones eléctricas de alto voltaje . Comisión Federal de Electricidad. pp 1-10.

Nordstrom, S., Birke E. And Gustavsson L. (1983). Reproductive Hazards Among Workers at High Voltage Substations. Bioelectromagnetics.4: 91-101.

Parker S.P. (1993). Encyclopedia of Physics. Second Edition. McGraw-Hill, USA. pp. 337-339.

Pearce N.E., Sheppard R.A., Howard J.K., Fraser J. and Lilley B.M. (1985). Leukemia in electrical workers in New Zeland. Lancet. 18: 811-812.

Perry T.S. (1993). Today's view of magnetic fields IEEE SPECTRUM. December 14-23.

Pilla A.A. (1993). State of the art in electromagnetic therapeutics. Electricity and Magnetism in Biology and Medicine. 3: 17-22.

Postow E. and Swicord M.L. (1996). Modulated Fields and "window" Effects, in: Polk C., Postow E. (Eds).Handbook of Biologycal Effects of Electromagnetic Fields. CRC Press, Boca Ratón, USA. pp. 535-581.

Pothakamury U.R., Barletta B.J., Barbosa G.V. y Swanson B.G. (1993). Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes. Revista Española de Ciencia y Tecnología de alimentos. 33: 479-489.

Rodan G.A., Bourret L.A. and Norton L.A. (1978). DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields. Science. 199:690-692.

Rojo A. (1981). Física de campos y ondas. Primera edición. Editorial Fondo Educativo Moderno Interamericano. pp. 132 - 145.

Simunic D (Ed). (1996). Biological Effects Relevant to Amplitud Modulated RF Fields. Proceedings of a COST244 Workshop. Kuopio, 3-4 september, 1995. COST244: Biomedical Effects of EMF. CEC. XIII. 244/6/96, European Union.

Stewart J.R. (1979). The electrostatic and electromagnetic effects of A.C. transmission Lines. IEEE. U.S.A. pp 4-10 .

Strother G.K. (1980). Física aplicada a las ciencias de la salud. Mc Graw Hill p 312 .

Takahashi K., Kaneko I., Date M. and Fukada E. (1987). Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. Experientia. 43:331-332.

Tenforde T.S. (1991). ELF field interactions at the animal, tissue, and cellular levels. Electromagnetics in biology and medicine. 39: 225-245.

Tomenius L., Hellstroem L. and Enander B. (1982). Electrical constructions and 50 Hz magnetic field at the dwelling of tumor cases (0-18 years of ages) in the county of Stockholm. Proceedings of the International Symposium on Occupational Health and Safety in Mining and Tunneling ,Prague. p 117.

Valberg P.A. (1995). Designing EMF experiments: What is required to characterize exposure?. Bioelectromagnetics 16: 396-401.

Wertheimer C.L. and Leeper E. (1979). Electrical wiring configurations and childhood cancers. Am. J. Epidemiol. 109: 273-284.

Wood R. (1991). Magnetismo: De la brújula a los imanes superconductores. 1ª. Edición. McGraw-Hill. Capítulo 12 Biomagnetismo. pp 165-173.

Wright W., Peters J.M. and Mack T.M. (1982). Leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. Lancet. 15: 1160-1161.

Yasui M., Otaka Y. (1993). Facility for chronic exposure of rats to ELF magnetic fields. Bioelectromagnetics 14: 535-544.

Yen-Patton G.P.A., Patton W.F., Beer D.H. and Jacobson B.S. (1988). Endothelial response to electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. J. Cell. Physiol. 134:37-46.

CAPITULO II

Efectos Citológicos de Campos Electromagnéticos de 60 Hz en Linfocitos Humanos *in vitro*.

ANTECEDENTES

Se han realizado diversas investigaciones que utilizan al linfocito y células linfoides como modelo de estudio para evaluar el efecto biológico de CEM (Maimon et al., 1986; Rosenthal y Obe, 1989; García-Sagredo et al., 1990; Khalil y Qassem, 1991; Cadossi et al., 1992; Antonopoulos et al., 1995; McCann et al., 1998). Asimismo, en lo que concierne a los efectos genotóxicos y citotóxicos de los CEM se han realizado una gran diversidad de estudios en diferentes organismos desde bacterias hasta mamíferos, incluyendo al hombre. A continuación se expondrá, a manera de marco teórico, los fundamentos de las técnicas citogenéticas empleadas en este estudio, así como algunos de los trabajos más relevantes que utilizaron éstos y otros procedimientos en la evaluación del potencial citotóxico y/o genotóxico de los campos electromagnéticos.

Citogenética

La mitosis es el mecanismo por el cual se dividen los núcleos de las células somáticas. En esencia, en este proceso de división una célula produce dos células hijas idénticas. La división celular por mitosis ocurre en todos los tejidos del organismo a partir de la formación del cigoto y continúa toda la vida, aunque a un ritmo menos acelerado (Lisker y Armendares, 1994).

La mitosis puede dividirse en etapas, el proceso global es contínuo y no ocurre en partes separadas. Se divide en las siguientes fases (Emery, 1981):
PROFASE: En esta etapa es posible observar los cromosomas duplicados, además se comienza a formar el huso entre los dos centríolos y la envoltura nuclear prácticamente ha desaparecido.

PROMETAFASE: Desaparece la membrana nuclear y los cromosomas se orientan hacia el centro del núcleo, en el llamado plano o placa ecuatorial. Al mismo tiempo se forma el huso, estructura de la cual dependen los desplazamientos de los cromosomas durante la mitosis.

METAFASE: Los cromosomas se encuentran alineados en el centro, justo en la placa ecuatorial.

ANAFASE: El centrómero de cada cromosoma se divide en dos partes y las dos cromátides se desplazan a los extremos o polos opuestos del huso.

TELOFASE: Los cromosomas hijos se han separado por completo, comienza a reaparecer la membrana nuclear. Las dos células nuevas se separan y sus núcleos una vez más pasan a la siguiente interfase.

CITOCINESIS: Implica la división del citoplasma con la correspondiente repartición de organelos.

Por más de medio siglo los citogenetistas han estudiado los cromosomas de las plantas y de los vertebrados, relacionando las anormalidades numéricas y estructurales de los cromosomas con las características que transmiten, lo cual hizo posible que dejara de ser motivo de debate el papel de los cromosomas como portadores de genes (Armendares, 1968).

Hay 46 cromosomas en cada célula humana y cada cromosoma es un miembro de un par homólogo. Existen por lo tanto 23 pares de cromosomas en cada célula: un miembro de cada par procede del padre del individuo, y el otro de la madre. Veintidós pares son iguales en los machos y hembras y se denominan autosomas, pero el par restante, los cromosomas sexuales, difieren en ambos sexos y son de gran importancia en su determinación. En la hembra humana, los cromosomas sexuales son también idénticos y se denominan cromosomas X. En el macho humano, los dos cromosomas sexuales son muy diferentes: uno posee una forma igual al cromosoma femenino X, el otro,

mucho mas pequeño, se denomina cromosoma Y (Thompson y Thompson, 1968).

El estudio cuidadoso de una metafase revela que los cromosomas difieren en tamaño, lo que permite clasificarlos en grandes, medianos y pequeños. Por otra parte, la posición del centrómero, que es el elemento que une las dos cromátides, es variable: puede encontrarse casi a la mitad del cromosoma, en cuyo caso recibe el nombre de metacéntrico, o cerca de la parte terminal, y entonces se trata de un acrocéntrico, o finalmente puede ocupar una posición media entre la parte central y posición terminal, constituyendo así el cromosoma llamado submetacéntrico. Con estos dos parámetros, tamaño de los cromosomas y posición del centrómero, fue posible ordenar en forma convencional el cariotipo humano normal y a la vez hacer la clasificación de las variaciones patológicas del mismo (González-Ramos, 1985).

Técnica Citogenética para determinar los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH)

Al inicio de la década de los años 1970, se desarrollaron trabajos clásicos que establecieron una metodología que permitía la tinción diferencial de las cromátides. El procedimiento consiste en adicionar al medio de cultivo, 24 horas después de la siembra, una base análoga de 5' Bromodeoxiuridina (BrdU) la cual es incorporada en las células en vez de la timina. Aquellas cromátides que difieren en el número de cadenas de ADN que han sido sustituidas por BrdU pueden distinguirse fácilmente si los cromosomas se ponen en contacto con el fluorocromo de Hoescht 33258, que tiñe el ADN normal pero no aquel cuyas dos cadenas han sido sustituidas por BrdU (Salamanca, 1990).

El intercambio de cromátidas hermanas resulta del rompimiento y unión de ADN en sitios aparentemente homólogos de dos cromátidas de un cromosoma, esto fue visualizado por primera vez al utilizar timidina tritiada para marcar el ADN en células en división (Chaganti et al., 1974).

Por otra parte se sabe que este fenómeno ocurre durante la replicación del material genético (Wolff et al., 1974), y probablemente involucra rompimientos, recombinación y nuevamente la unión del ADN.

La técnica para determinar el ICH es relativamente simple y es ampliamente usada en estudios de toxicología genética. Mediante este procedimiento se ha demostrado que la frecuencia de ICH es aumentada dramáticamente cuando células o animales (incluyendo al humano), son expuestos a mutágenos y carcinógenos conocidos (Perry y Evans, 1975; Lambert et al., 1976; Latt, 1981).

La frecuencia normal de ICH en linfocitos humanos periféricos fluctúa entre 7-10 por célula, pero también se ha reportado en un rango de 2 hasta 45 por célula en individuos no expuestos a mutágenos (Alhadeff y Cohen, 1976; Lambert et al., 1976; Crossen et al., 1977; Galloway, 1977; Carrano et al., 1980).

Se ha observado que los ICH se incrementan en enfermedades como el síndrome de Bloom (Chaganti y cols., 1974), esclerosis múltiple (Sutherland y cols., 1980) y en células de individuos con *xeroderma pigmentosum* expuestos a luz ultravioleta y agentes alquilantes (Wolff, 1977).

Por otra parte los estudios realizados por diversos grupos (Perry y Evans, 1975; Steka y Wolff, 1976; Raposa, 1978) muestran que varios clastógenos (factores que rompen el DNA) son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de ICH por lo que ésta técnica se empezó a utilizar en la detección de mutágenos tanto *in vivo* como *in vitro*. Los primeros

estudios indicaron que la prueba tenía una alta sensibilidad, ya que se requerían concentraciones mucho menores de una sustancia para inducir intercambio de cromátidas hermanas que para producir aberraciones cromosómicas. Estudios posteriores han demostrado que esta alta sensibilidad se presenta en la mayoría de los casos cuando se usan agentes alquilantes, pero no es tan sensible cuando se utilizan otros agentes químicos.

Una ventaja adicional del análisis citogenético de intercambio de cromátidas hermanas, es que además de poderse evaluar la frecuencia de éstas, es posible medir otros parámetros que son indicadores del grado de proliferación celular. Así por ejemplo, contabilizando las células que se encuentran en primera, segunda y tercera división se estima la cinética de proliferación celular. Esto último se hace observando células cuyos pares de cromátidas están teñidas de obscuro y se encuentran en primera división, aquellas con una cromátida teñida y otra no, o sea una cromátida como "arlequín", se consideran en segunda división y aquellas metafases en que las dos cromátidas se tiñen claro (como fantasma o arlequín) se clasifican en tercera división. En la Figura II.1 se puede apreciar un esquema que ilustra lo anterior. La cinética de proliferación celular es considerada como un biomarcador para determinar agentes tóxicos, y se piensa que uno de los mecanismos por el cual los compuestos químicos pudieran afectar las células, es por la interacción con moléculas claves en la superficie de los linfocitos (Synder y Valle, 1991).

Otro parámetro que se determina junto con la cinética de proliferación célular es el índice mitótico, el cual consiste en determinar el porcentaje de células que están en mitosis. Este índice ha sido utilizado para la evaluación del crecimiento de cultivos desde los años 60, pero recientemente ha vuelto a

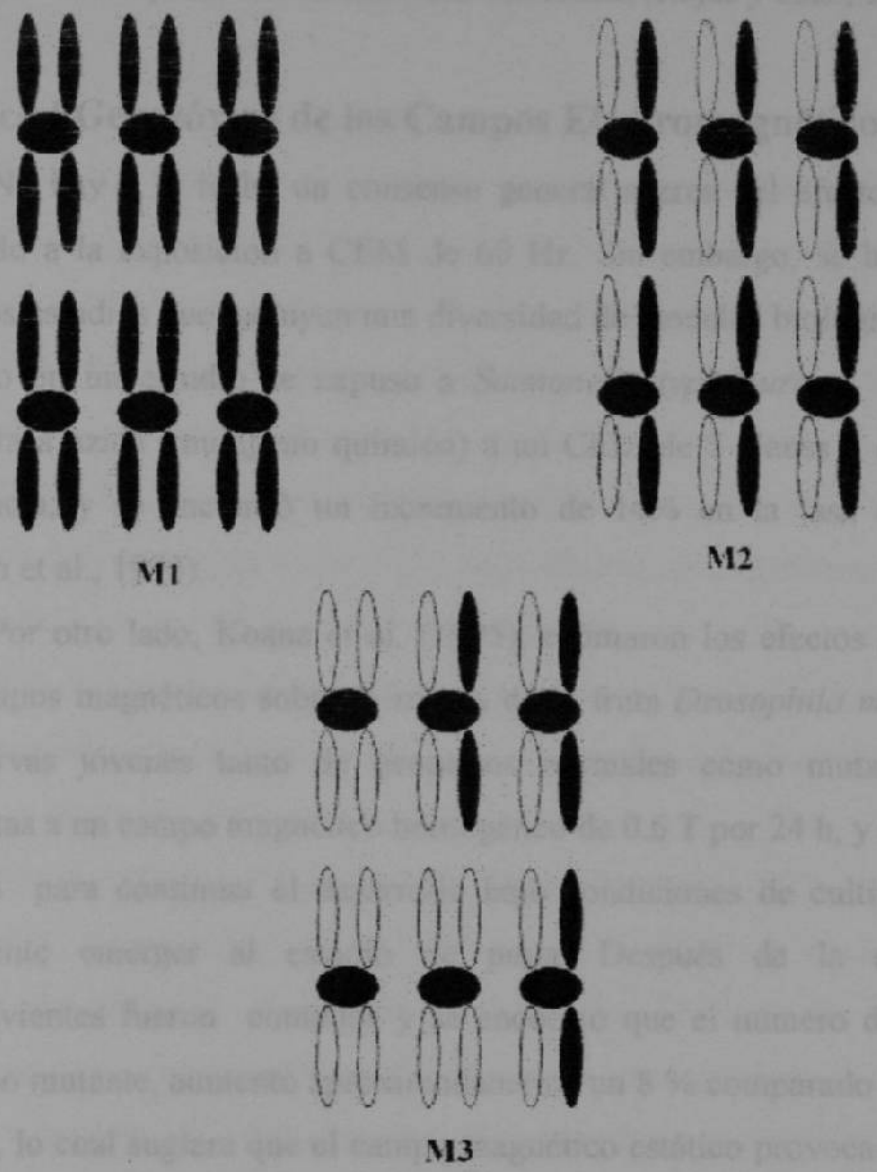

Figura II.1

primera división, (M2) metafases en segunda y (M3) tercera división. En la tercera división no siempre el 100 % de los cromosomas aparecen claros pero con algunos que aparezcan asi ya se considera la tercera generación celular.

ser utilizado en la investigación de mecanismos de toxicidad sobre todo de fármacos antineoplásicos con actividad citotóxica (Rojas y cols., 1992).

Potencial Genotóxico de los Campos Electromagnéticos

No hay a la fecha un consenso general acerca del efecto genotóxico atribuído a la exposición a CEM de 60 Hz. Sin embargo, se han realizado diversos estudios que incluyen una diversidad de modelos biológicos. Así, por ejemplo en un estudio se expuso a *Salmonella typhimurium* previamente expuesta a azida (mutágeno químico) a un CEM de 2 Gauss y de 60 Hz de frecuencia, y se encontró un incremento de 14% en la tasa de mutación (Tabrah et al., 1994).

Por otro lado, Koana et al. (1995), estimaron los efectos genéticos de los campos magnéticos sobre la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*: Las larvas jóvenes tanto de genotipos normales como mutantes, fueron expuestas a un campo magnético homogéneo de 0.6 T por 24 h, y luego fueron dejadas para continuar el desarrollo bajo condiciones de cultivo normal y finalmente emerger al estadío de pupa. Después de la eclosión los sobrevivientes fueron contados y se encontró que el número de adultos de genotipo mutante, aumentó aproximadamente un 8 % comparado con el grupo control, lo cual sugiere que el campo magnético estático provoca daño a nivel del DNA de células larvarias eliminando los homocigóticos recesivos.

En otro estudio Kowalczuk et al. (1996), investigaron el potencial mutagénico usando un ensayo letal dominante en ratones. Un total de 42 ratones macho fueron expuestos por 8 semanas a un CEM de 10 mT y 50 Hz de frecuencia. Por otro lado 47 ratones macho fueron manejados como grupo control. Cada animal se apareó con 2 hembras en la primera, tercera, quinta, séptima y novena semana después de la exposición al campo magnético. Se

encontró que las exposiciones a campos magnéticos de 10 mT no parecen inducir mutaciones letales en las células germinales de los animales tratados.

CEM y Efectos en Cromosomas

En lo que respecta al efecto en cromosomas, Nordenson et al. (1994) expusieron células amnióticas de humano a un campo magnético sinusoidal de 30μT y de 50 Hz por espacio de 72 h y encontraron un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas comparado con un grupo no expuesto. En contraste con esto, Galt et al. (1995) probaron el efecto de un CEM de 30μT de 50 Hz sobre células amnióticas humanas durante un período de exposición de tres días, con el fin de confirmar los experimentos realizados por Nordenson (op. Cit.) en los cuales el rompimiento de cromosomas y la formación de gaps era relativamente alta después de la exposición. Pero ellos no encontraron incremento de daño a los cromosomas en las células expuestas a campos electromagnéticos.

En un estudio realizado por D'Ambrosio et al. (1985), se encontró un incremento significativo de aberraciones cromosómicas cuando exponían cultivos de linfocitos periféricos de bovino a CEM de 50 Hz. También encontraron un incremento en el número de aberraciones cromosómicas en células tumorales de ratón después de exponerlas a campos electrostáticos y también en linfocitos expuestos a microondas.

En otra investigación, Cohen et al. (1986) expusieron líneas celulares linfocíticas de pacientes con síndromes de inestabilidad cromosómica a campos magnéticos de 1-2 Gauss de 60 Hz, y no encontraron efecto en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas y rompimiento de cromosomas.

En otro trabajo (Bauchinger et al., 1981) se analizaron linfocitos humanos periféricos de 32 trabajadores ocupacionalmente expuestos a transformadores que generan campos magnéticos intensos por más de 20 años y no se encontraron cambios en la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni del intercambio de cromátidas hermanas.

En otra investigación, se expusieron linfocitos humanos *in vitro* a campos electromagnéticos de 2.5 mT. y los resultados obtenidos no demostraron efecto genotóxico ocasionado por los mismos (Bersani et al., 1988).

Por otra parte Rosenthal y Obe (1989), expusieron linfocitos humanos periféricos a CEM y encontraron que no alteraban la frecuencia espontánea de intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas, pero cuando se sometían linfocitos previamente expuestos a mutágenos químicos a la acción de los CEM, se encontró una frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas mayor qué cuando estaban en presencia del mutágeno químico, pero en ausencia del campo magnético, lo cual sugería un efecto sinérgico.

En otro trabajo se estudió el efecto *in vitro* de los campos electromagnéticos pulsantes de 10, 20 y 40 Gauss por 48 horas sobre linfocitos humanos periféricos, utilizando la prueba citogenética de intercambio de cromátidas hermanas y no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos expuestos a CEM y el testigo (García-Sagredo et al., 1990).

Sin embargo Khalil y Qassem (1991) expusieron linfocitos humanos a CEM de 1.05 mT y frecuencia de 50 Hz por 24, 48 y 72 h y encontraron disminuida la actividad mitótica y un alto índice de aberraciones cromosómicas.

Por otra parte, Scarfi y Franceschetti (1991) realizaron exposiciones de linfocitos humanos a campos eléctricos (0.5,2.0,5.0 kV/m) de 50 Hz para ver si estos producían efecto genotóxico (estudiando la formación de micronúcleos) *in vitro*. Se encontró que los campos eléctricos de 50 Hz de frecuencia no producen efectos genotóxicos a nivel cromosómico.

En otro trabajo realizado en seres humanos, se determinó la frecuencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, índice de replicación y micronúcleos en linfocitos periféricos de 27 muestras de trabajadores de fuentes de alta tensión, que tuvieron periodos prolongados de exposición a los CEM de 50 Hz y 27 muestras de trabajadores de la línea telefónica que servían como grupo de referencia. Lo que se obtuvo fue que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el análisis de intercambio de cromátidas hermanas, índice de replicación o formación de micronúcleos. Sin embargo, se observó un incremento con el rompimiento de cromosomas en los trabajadores de fuentes de alta tensión comparado con el grupo de referencia, por lo cual se sugiere que la exposición a CEM 50 Hz está asociada con un incremento en el rompimiento de cromátidas (Valijus et al., 1993).

Zwingelberg y cols. (1993) investigaron el efecto de exposiciones prolongadas a campos magnéticos de 30 mT de 50 Hz de frecuencia sobre la proliferación celular y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos periféricos por 7 y 28 días. Se utilizó como control positivo ciclofosfamida (mutágeno químico). Los resultados indicaron que los campos magnéticos no afectaron a la proliferación celular ni el intercambio de cromátidas hermanas.

Más recientemente, tratando de aportar datos al posible daño cromosómico ocasionado por CEM, fueron expuestos linfocitos periféricos

humanos a campos magnéticos estáticos y oscilantes, para luego utilizar la prueba citogenética de micronúcleos y determinar el efecto producido por agentes genotóxicos a los cromosomas. El primer grupo se expuso a un campo magnético de 150μT de 50 Hz y de 75 y 150 μT de 32 Hz con el campo geomagnético estático nulificado. En el segundo grupo, las células fueron expuestas a 75 y 150μT de 32 Hz junto con un campo magnético estático de 42μT. Se encontró un incremento de micronúcleos estadísticamente significativo con respecto a un testigo cuando se exponían linfocitos a campos magnéticos estáticos y oscilantes (Tofani et al., 1995). En contraste, Scarfi et al., (1999) no encontraron indicios de que los campos magnéticos fueran agentes clastogénicos ya que no se afectó la frecuencia de micronúcleos de linfocitos humanos expuestos a CEM de 50 Hz.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los campos electromagnéticos de 60 Hz son potencialmente capaces de afectar la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, índice mitótico y cinética de proliferación celular de linfocitos humanos *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de campos electromagnéticos de 60 Hz en linfocitos humanos *in vitro* expuestos a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0 mT en lo que concierne a frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, índice mitótico y cinética de proliferación celular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

A) Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de CEM de 60 Hz a intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 mT sobre cultivos de linfocitos humanos expuestos por 72 h contínuas.

B) Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de una exposición combinada de un CEM de 2.0 mT de 60 Hz por 72 h más el mutágeno químico Mitomicina-C, 10^{-7} M.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron linfocitos humanos obtenidos de sangre venosa periférica procedente de un individuo de sexo masculino, clínicamente sano, no fumador de 23 años de edad.

EXPOSICIÓN DE CULTIVOS CELULARES A LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS.

Los cultivos de linfocitos fueron colocados dentro de un solenoide como el indicado en el Capítulo I de este trabajo y que corresponde al sistema de exposición in vitro. Por su parte, las Figuras I.6 y I.7 detallan la forma en que fueron dispuestos los frascos del cultivo dentro de la incubadora. Las intensidades magnéticas utilizadas en estos experimentos fueron de 1.0, 1.5 y 2.0 mT.

CULTIVOS DE SANGRE VENOSA.

Utilizando una jeringa de 10 ml heparinizada (1000 U/ml) se tomaron 5 ml de sangre venosa periférica, se agitó la sangre para después sembrar 11 gotas de ésta en 4 ml de medio de cultivo RPMI 1640 adicionado con L-glutamina (GIBCO), y 1 ml de suero fetal de ternera (GIBCO). El procedimiento de cultivo se realizó en una campana de flujo laminar, de acuerdo a la técnica propuesta por Moorhead et al. (1960).

Posteriormente los cultivos se incubaron a 37°C. A las 24 hr se agregó 1.0 ml de 5′-Bromodeoxiuridina (20 μg/ml) y se mantuvieron en obscuridad. Cumplidas las 72 hr se añadieron 0.1 ml de colchicina (3.9 μg/ml) durante 1

hr. Después el contenido de los frascos se pasó a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente la pastilla celular con 5 ml de KCl 0.075 M con una pipeta Pasteur y por 20 minutos se mantuvieron a 37°C, enseguida se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron con 5 ml de solución fijadora (metanol-ácido acético 3:1). El lavado con la solución fijadora se repitió hasta que se obtuvo un botón celular blanco, el cual se resuspendió en 1 ml de solución fijadora y se mantuvo a 4°C por 24 h..

PREPARACION DE LAMINILLAS

Finalizado el tiempo, las células se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante hasta 0.5 ml de la misma solución fijadora. Con una pipeta Pasteur se resuspendió y se goteó desde una altura de 30 cm sobre un portaobjetos desengrasado en etanol absoluto, el cual se secó a la flama. Se observó al microscopio en contraste de fases para asegurarse de que se habían obtenido preparaciones aceptables para su posterior procesamiento.

TINCION

Después de 24 hrs, las laminillas se sumergieron por 30 min en una solución de colorante Hoechst 33258 (1 μg/ml) por una hora en ausencia de luz, se lavaron en agua destilada y se secaron. Posteriormente se colocaron en amortiguador McIlvane a pH 6.8 (Na_2HPO_4 0.2 M y ácido cítrico 0.1 M) y se expusieron a luz ultravioleta y a una temperatura de 60°C durante 1.5 hr a una distancia de 10 cm. Finalizado este proceso las laminillas se lavaron con agua

bidestilada y se tiñeron con colorante Giemsa pH 6.8 (Sigma chemical CO. St. Louis USA) por 3 minutos.

FRECUENCIA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (I.C.H.)

Este aspecto fue evaluado en 50 metafases en segunda división de cultivos de 72 h. Se determinaron intercambios terminales e intersticiales, éstos últimos con un valor del doble de los primeros debido a que su formación requiere el doble de eventos que los terminales.

INDICE MITOTICO

Las preparaciones se observaron en un microscopio de luz en objetivo 10X y se contaron 2,000 núcleos totales, de cultivos de 72 h y de éstos se determinó cuantas metafases existian. El valor del índice mitótico se determinó de la siguiente manera:

$$\text{I.M.} = \frac{\text{Numero total de metafases}}{\text{Numero total de nucleos}}$$

CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR (C.P.C.)

La C.P.C. fue evaluada en las primeras 100 metafases observadas, determinando el número de células en primera división (M1), segunda división (M2) y tercera división (M3). Se consideraron metafases en primera división aquellas cuyos cromosomas se encontraron teñidos completamente de obscuro, segunda división a los cromosomas que estaban conformados por una cromátida obscura y una clara y tercera división a las metafases que se caracterizan por presentar algunos cromosomas completamente claros como se

observa en la microfotografía de la Figura II.2. Un indicador de la C.P.C. es el Indice Proliferativo (IP) que se calculó de la siguiente forma:

$$I.P. = (1)M1 + (2)M2 + (3)M3$$

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron cuatro experimentos independientes, que consistieron en lo siguiente:

Experimento No.1.- Tratamiento con CEM de intensidad 1.0 mT

Experimento No.2.- Tratamiento con CEM de intensidad 1.5 mT

Experimento No.3.- Tratamiento con CEM de intensidad 2.0 mT

Experimento No.4.- Tratamiento combinado con Mitomicina-C 10^{-7} M más CEM de intensidad 2.0 mT/72 h.

Para cada uno de los tratamientos se realizaron tres cultivos, y se compararon con un testigo negativo T(-) no expuesto a factores físicos o químicos, y un testigo positivo T(+), Mitomicina-C (10^{-7} M), éste sirvió como control interno de los experimentos, ya que se sabe que esta substancia actúa como un depresor de la división celular, además de ser un agente genotóxico bien conocido (Craig-Holmes y Shaw, 1977). Esto también se llevó a cabo por triplicado, es decir en cada experimento se procesaron un total de nueve cultivos.

PREPARACION DEL TESTIGO POSITIVO CON MITOMICINA-C

Este consistió en agregar 50 µl de Mitomicina-C (a una concentración final de 1 x 10^{-7} M) a los cultivos de 48 horas, para después continuar el procesamiento de la forma antes mencionada.

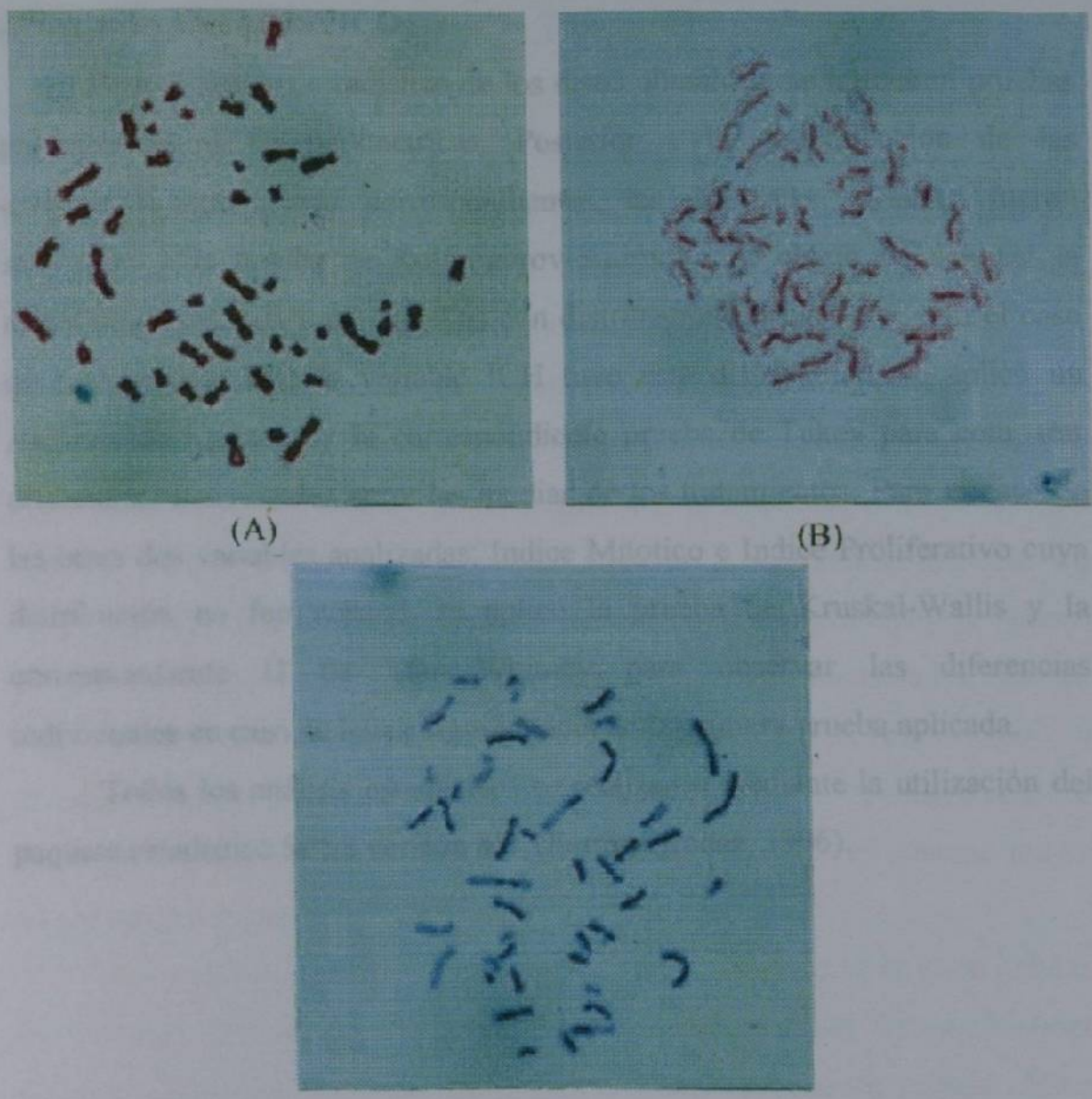

Figura II.2 Microfotografía que muestra metafases de linfocitos humanos teñidos mediante la Técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas (A) Metafase en primera división (B) Metafase en segunda división y (C) en tercera división (100 x).

ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas. Posterior a la determinación de las estadísticas descriptivas correspondientes, las diferentes variables fueron sometidas a la prueba de Kolmogorov-Smirnov con objeto de conocer la distribución de cada una. Aquellas con distribución normal, que para el caso de este estudio solo la variable ICH tuvo esta distribución, se aplicó un Análisis de Varianza y la correspondiente prueba de Tukey para comparar diferencias individuales entre las medias de los tratamientos. Para el caso de las otras dos variables analizadas; Indice Mitotico e Indice Proliferativo cuya distribución no fue normal, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y la correspondiente U de Mann-Whitney para observar las diferencias individuales en caso de haber significancia en la primera prueba aplicada.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización del paquete estadístico SPSS versión 8.0 (Ferrán-Aranaz, 1996).

RESULTADOS

En la Figura II.3 se muestran metafases con la técnica de ICH en linfocitos humanos periféricos tratados con CEM oscilantes de 60 Hz así como el testigo positivo tratado con Mitomicina-C y el testigo negativo, asimismo se muestra el tratamiento combinado de Mitomicina-C 10^{-7} M y 2.0 mT de CEM. Por otra parte en la tabla II.1 se muestran los resultados de la frecuencia de ICH para los cuatro experimentos independientes. Los valores expresados como la media aritmética, aparecen comparados con sus testigos para cada uno de los tratamientos. El análisis de varianza reveló que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre el testigo negativo y el tratamiento con campo magnético a las tres intensidades usadas. Asimismo se constató que no hubo un efecto sinérgico de la Mitomicina-C y el tratamiento con 2.0 mT de CEM. Como era de esperarse, el testigo positivo que contenía Mitomicina-C, mostró una frecuencia significativamente mayor que el testigo negativo ($p < 0.05$).

Por otro lado, se estimó el efecto de los CEM sobre la división celular, en la tabla II.2 se presentan los valores promedio del Indice Mitótico obtenidos para los diferentes tratamientos y sus respectivos testigos. Estos resultados analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis y posteriormente por parejas con la U de Mann-Whitney, determinaron que el CEM, en todas sus intensidades incrementó significativamente la división de los linfocitos ($p < 0.05$). Asimismo, se observó un efecto antagónico del campo magnético y la Mitomicina-C, ya que en el tratamiento que combina los dos factores se presentó un incremento del Indice Mitótico cuando se expuso a 2.0 mT de CEM mas Mitomicina-C 10^{-7} M con respecto a un cultivo tratado solamente con la droga ($p < 0.05$).

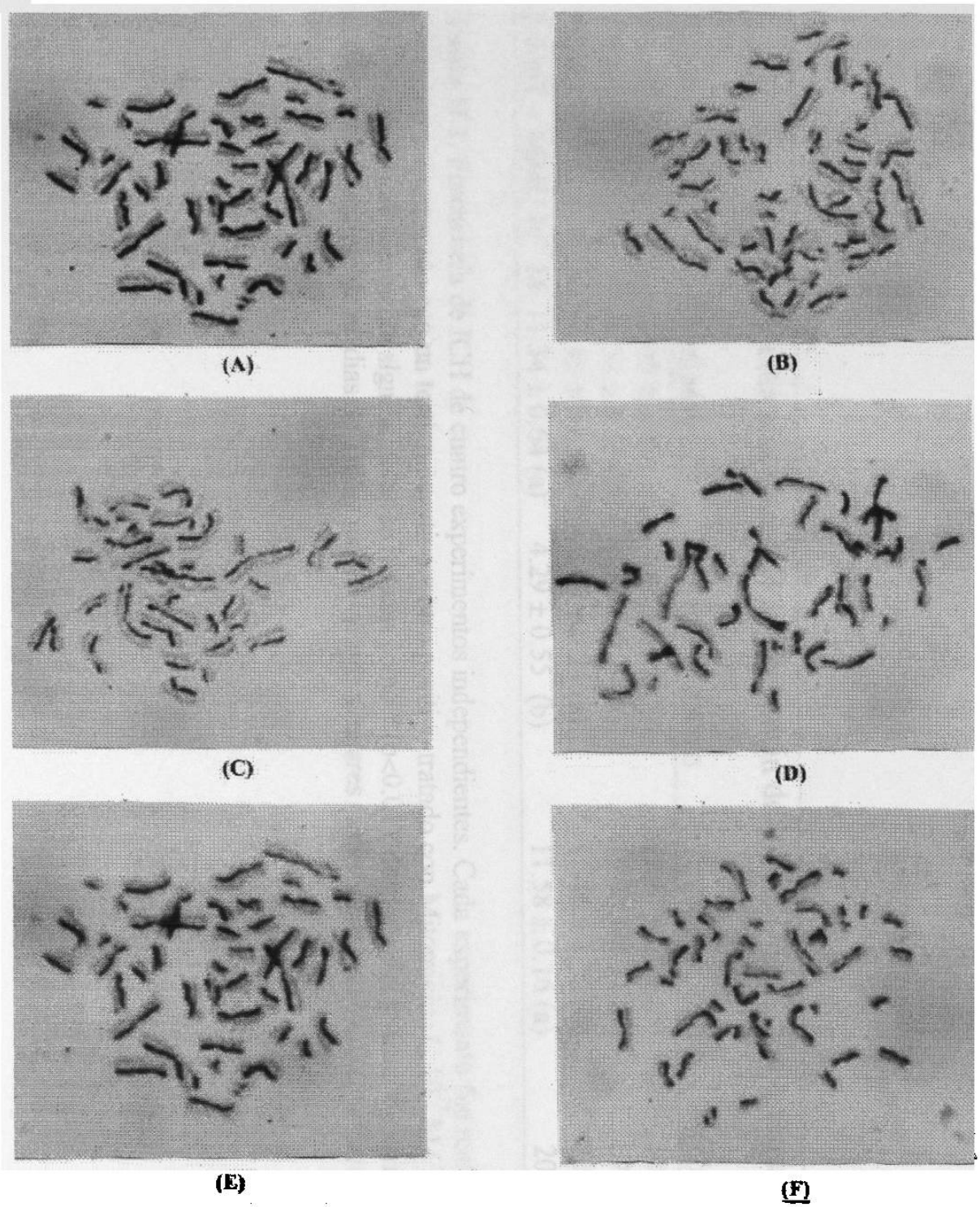

Figura II.3 Microfotografía de metafases de cromosomas obtenidas de linfocitos humanos sometidos a diferentes tratamientos in vitro (A): Testigo negativo (B): Testigo positivo, expuesto a Mitomicina-C (C): 1.0 mT (D): 1.5 mT (E): 2.0 mT (F): 2.0 mT / Mitomicina-C.

	Media aritmética de la frecuencia de ICH ± Desviación estandar			
Experimento	Tratamiento	Testigo negativo	Testigo positivo	Valor F
1.0 mT	5.05 ± 0.08 (a)	4.85 ± 0.12 (a)	13.70 ± 0.23 (b)	3090.75 *
1.5 mT	4.58 ± 0.16 (b)	4.84 ± 0.29 (a)	11.96 ± 0.35 (b)	679.05 *
2.0 mT	4.45 ± 0.65 (a)	3.99 ± 0.24 (a)	11.46 ± 1.32 (b)	70.36 *
2.0 mT + MMC 10^{-7} M	11.34 ± 0.64 (a)	4.29 ± 0.55* (b)	11.58 ± 0.16 (a)	208.41 *

Tabla II.1. Frecuencia de ICH de cuatro experimentos independientes. Cada experimento fue realizado por triplicado y comparado con un testigo negativo y otro positivo tratado con Mitomicina C 10^{-7} M (MMC) . Las diferencias estadísticamente significativas se indican como * ($p<0.01$), después del análisis de varianza. La comparación múltiple de medias de Tukey indicó valores similares (a) y diferentes (b). Los valores del estadístico F son asimismo mostrados.

	Media aritmética del índice mitotico ± Desviación estandar			
Experimento	Tratamiento	Testigo negativo	Testigo positivo	Valor x^2
1.0 mT	6.2 ± 0.20	4.4 ± 0.20	3.4 ± 0.10	7.26 *
1.5 mT	6.6 ± 0.10	5.6 ± 0.20	3.3 ± 0.10	7.32 *
2.0 mT	6.1 ± 0.10	4.7 ± 0.30	3.1 ± 0.20	6.87 *
2.0 mT + MMC 10^{-7} M	3.5 ± 0.10	4.6 ± 0.10	2.8 ± 0.20	7.26 *

Tabla II.2. Resultados del Índice Mitótico de cuatro experimentos independientes. Cada experimento fue realizado por triplicado y comparado con un testigo negativo y otro positivo tratado con Mitomicina C 10^{-7} M (MMC) . Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis y se encontraron diferencias estadísticamente significativas indicadas como * ($p<0.05$). Los valores del estadístico x^2 se indican.

En lo concerniente al análisis de la cinética de proliferación celular (C.P.C.) mediante el recuento de metafases en primera, segunda y tercera división que se observaron con la técnica de ICH, se determinó el Indice Proliferativo. En la tabla II.3 se presentan los valores promedio de los Indices Proliferativos para cada uno de los tratamientos y sus testigos. Se aprecia que en las tres intensidades magnéticas se presentó un incrementó en el Indice Proliferativo con respecto al testigo negativo. El análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis y posteriormente por parejas con la U de Mann-Whitney reveló diferencias significativas ($p<0.05$). Asimismo se observó, como era de esperarse, una baja en la división celular en el testigo positivo. En el caso del tratamiento combinado de 2.0 mT de CEM más Mitomicina-C se observó que aunque la proliferación celular disminuye con respecto al testigo negativo, esta disminución fue menor que la observada en el testigo positivo, tratado únicamente con Mitomicina-C, lo que sugiere un efecto antagónico del CEM con respecto al mutágeno químico, mismo efecto que previamente había sido observado para el caso del Indice Mitótico.

	Media aritmética del Índice Proliferativo ± Desviación estandar			
Experimento	Tratamiento	Testigo negativo	Testigo positivo	Valor x^2
1.0 mT	2.34 ± 0.04	2.12 ± 0.12	1.89 ± 0.06	6.87 *
1.5 mT	2.52 ± 0.02	2.06 ± 0.07	1.77 ± 0.04	7.20 *
2.0 mT	2.52 ± 0.02	2.20 ± 0.03	1.58 ± 0.04	5.80 *
2.0 mT + MMC 10^{-7} M	1.85 ± 0.02	2.18 ± 0.07	1.64 ± 0.05	6.25 *

Tabla II.3. Resultados del Indice Proliferativo de cuatro experimentos independientes. Cada experimento fue realizado por triplicado y comparado con un testigo negativo y otro positivo tratado con Mitomicina C 10^{-7} M (MMC). Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis y se encontraron diferencias estadísticamente significativas indicadas como * ($p<0.05$). Los valores del estadístico x^2 se indican.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se puede asumir que no fue posible demostrar un efecto genotóxico inducido por los CEM de 60 Hz de frecuencia sobre cultivos de linfocitos humanos periféricos expuestos a intensidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0 mT, a juzgar por los datos encontrados mediante el análisis de la frecuencia de ICH, al menos a este nivel, no se encontraron cambios citogenéticos al comparar los cultivos expuestos a las tres intensidades con cultivos no expuestos. Estos hallazgos se relacionan con los encontrados por Cohen et al. (1986) quienes expusieron linfocitos a CEM de 60 Hz a intensidades de 0.1 y 0.2 mT y no encontraron efecto sobre la frecuencia de ICH. Asimismo, Rosenthal y Obe (1989) no encontraron alteraciones en la frecuencia de ICH de cultivos de linfocitos tratados con intensidades más altas a las utilizadas en este trabajo (5.0 y 7.5 mT). Por otro lado, se ha investigado el efecto de CEM *in vivo* sobre la frecuencia de ICH a grandes intensidades (30 mT) y tampoco se han detectado alteraciones en la frecuencia de ICH en ratas (Zwingelberg, 1993).

Es posible, no obstante, que con la prueba de ICH no se hubiesen detectado cambios que con otros análisis citogenéticos sí se llegasen a presentar, ya que en un estudio más reciente, Khalil y Qassem (1991), encontraron que no se afectaba la frecuencia de ICH en linfocitos expuestos a CEM de 1.05 mT y de 50 Hz por 72 h, pero por otra parte sí observaron un incremento en las aberraciones cromosómicas de las células tratadas magnéticamente.

En lo que concierne al tratamiento combinado CEM más Mitomicina-C, no se encontró efecto sinérgico aparente y nuestros hallazgos concuerdan con los señalados por Zwingelberg et al. (1993) quienes utilizaron un tratamiento

combinado de ciclofosfamida y CEM y tampoco encontraron efecto sinérgico al exponer linfocitos a dichos agentes. En contraste, Rosenthal y Obe (1989) probaron la acción combinada de agentes químicos mutagénicos con CEM y detectaron sinergismo.

En otros trabajos, también se han intentado probar el sinergismo de los CEM con factores físicos tales como radiación ionizante, Cossarizza et al. (1989) trataron linfocitos previamente irradiados con rayos Gamma y expuestos a agentes químicos antiproliferativos y no hallaron efecto sobre la cinética de proliferación celular.

Por otra parte, en el presente estudio se observaron cambios significativos en lo que respecta a la proliferación celular de linfocitos expuestos a los CEM, manifestándose como un incremento en el Indice Mitótico así como en el Indice Proliferativo en todas las intensidades aquí probadas. Estos resultados son muy parecidos a aquellos obtenidos por Antonopolus et al. (1995) quienes al exponer cultivos de linfocitos a 5.0 mT de CEM de 50 Hz señalan un incremento en la división celular.

Otros estudios han revelado también que cuando linfocitos en cultivo se exponen a CEM que van de los 2.5 a los 7.5 mT presentan aumentos en la cinética de proliferación celular (Bersani et al. y Cols, 1988 ; Rosenthal y Obe, 1989). Por el contrario, Zwingelberg et al. (1993) no detectaron cambios en la cinética de proliferación celular cuando expusieron linfocitos *in vivo*, aunque ellos usaron una intensidad significativamente mayor a la aquí utilizada (30mT) y la exposición fue de siete días. Asimismo Cohen et al. (1986), no encontraron cambios significativos en el Indice Mitótico en linfocitos humanos *in vivo*, aunque en este trabajo se usaron intensidades de 0.1 y 0.2 mT que son 10 veces menores a las probadas en la presente investigación.

El presente estudio no concuerda con lo observado por Khalil y Qassem (1991), quienes informaron una disminución en la actividad mitótica de linfocitos expuestos a una intensidad muy parecida a la nuestra, ellos usaron 1.05 mT, sin embargo cabe mencionar que los CEM empleados eran pulsantes.

Para el tratamiento combinado de Mitomicina-C y CEM de 2.0 mT se pudo observar un efecto antagónico, ya que hubo una disminución menor en la cinética de proliferación celular en comparación con los cultivos que solo fueron tratados con Mitomicina-C. A la fecha no se ha encontrado en la literatura revisada el hallazgo de efectos antagónicos de los CEM y mutágenos químicos en células tratadas simultáneamente con ambos factores.

El incremento en la proliferación celular de los linfocitos sometidos a la acción de los CEM, ha sido explicado por cambios en las concentraciones de calcio intracelular que pueden ser los responsables de muchos de los efectos biológicos entre ellos la promoción de la división celular (Lichtman et al., 1983 ; Metcalf et al., 1986; Grinstein y Dixon, 1989). Por su parte, Liburdy (1992) también ha propuesto que durante la exposición a CEM oscilantes se ven sensiblemente alterados los flujos de calcio y en particular la concentración intracelular de este catión lo que estimularía el proceso de división celular.

Con los resultados encontrados en este trabajo se puede aseverar que bajo las condiciones experimentales aquí utilizadas, los campos electromagnéticos sí son capaces de modificar actividades celulares, como en este caso, la división celular. No se pudo demostrar un efecto genotóxico, sin embargo sería conveniente la utilización de otros procedimientos citogenéticos, como por ejemplo el análisis de aberraciones cromosómicas o de los sitios frágiles que aumentaran la sensibilidad del estudio. Otra

posibilidad de incrementar la confiabilidad de los resultados, sería el aumentar el tamaño muestral y contar así con linfocitos humanos de varios donadores. Asimismo, se recomienda un estudio *in vivo* en donde los mecanismos de reparación propios de la célula pudiesen revertir el efecto provocado por estas radiaciones de frecuencia extremadamente baja.

CONCLUSIONES

a) Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia en intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 mT no modificaron la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas de linfocitos humanos periféricos expuestos *in vitro*.

b) Los campos electromagnéticos incrementaron la velocidad de división de los linfocitos en todas las intensidades probadas.

c) Se observó un efecto antagónico de los campos electromagnéticos con respecto a la Mitomicina-C en lo concerniente a la cinética de proliferación celular.

LITERATURA CITADA

Alhadeff B. and Cohen M.M.(1976). Frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. I. med Sci. 12:1440-1447.

Antonopoulos A., Yang B.C., Estamm A., Heller W.D., Obe G. (1995). Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes *in vitro*. Mutat. Res. Lett. 346: 157.

Armendares S.S. (1968). Citogenética Humana y Patológica. Editorial Interamericana. Primera Edición. pp 53-54.

Bauchinger M., Hauf R., Schmid E. and Dresp J. (1981). Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380 kV-systems. Radiat Environ. Biophys. 19, 235-238.

Bersani F., Franceschi C., Monti D., Bologni A., Gatti C., Cadossi R. Nichelatti M., Moschini G. and Cossarizza A. (1988). The efects of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields (ELF) on human lymphocyte proliferation *in vitro* and DNA repair. Engineering in medicine and biology society 10th annual international conference. CH2566-8/88/0000--0906.

Cadossi R., Bersani F., Cossarizza A., Zucchini P., Emilia G., Torelli G. and Franceschi C. (1992). Lymphocytes and low-frecuency electromagnetic fields. The Fase b J. 6: 2667-2674.

Carrano A.V., Minkler J.L., Stetka D.G. and Moore D.H. (1980). Variation in baseline sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes. Environ. Mutagen. 2:325-337.

Chaganti R.S., Schonberg S. and German J. (1974). A many fold increase in sister chromatid exchange in Bloom's syndrome lymphocyte. Proc. Natl.. Acad. Sci. 71:4508-4512.

Cohen M.M., Kunska A. Astemborski J.A. and McCulloch D. (1986). The effect of low-level 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. Mutat. Res. 172:177-184.

Cossarizza A., Monti D., Bersani F., Canitini M., Cadossi R. Sacchi A. and C. Franceschi C. (1989). Extremely low frequency pulsed electromagnetic increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjets. Biochemical and biophysical research comunications. 160: 692-698.

Craig-Holmes A.P. and Shaw M. (1977). Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in culture human lymphocytes. Mutat. Res. 163: 375-384.

Crossen P.E., Drets M.E., Arrighi F.E. and Johnston D.A. (1977). Analysis of the frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. Hum. Genet. 35:345-352.

D'Ambrosio G., Scaglione A., Beradino D.D., Lioi M.B., Iannuzzi L., Mostacciuolo E. and Scarfi M.R. (1985). Chromosomal aberrations induced by ELF electric fields. J. Bioelectric. 4: 279-284.

Emery A.E. (1981). Genética Médica. Editorial Interamericana. Cuarta edición. pp. 44-45.

Ferrran-Aranaz M. (1996). SPSS para Windows. Editorial Mc Graw-Hill. Primera edición. pp 560.

Galloway S.M. (1977). Ataxia telangiectasia: the effects of chemical mutagens and X rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes. Mutat. Res. 45:343-349.

Galt S., Wahistrom J., Hamnerius Y., Holmqvist D. and Johannesson J. (1995). Study of effects of 50 Hz magnetic fields on chromosome aberrations and growth-related enzyme ODC in human amniotic cells. Bioelectrochem. and Bioen. 36: 1-9.

Garcia-Sagredo J.M., Parada L.A. and Monteagudo J.L. (1990). Effect on SCE in human chromosomes in vitro of low-level pulsed magnetic field. Environ. and mol. mutagen. 16:185-188.

González–Ramos M. (1985). Tratado de Citogenética Clínica. Ed. Salvat. Primera edición. pp 249-259.

Grinstein S. and Dixon S.J. (1989). Ion Transport, membrane potential and cytoplasmic Lymphocytes: Changes during activation. Physiol Rev. 69: 417-481.

Khalil A.M. and Qassem W. (1991). Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes *in vitro*: Chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics. Mutat. Res. 247:141-146.

Koana T., Ikehata M., Nakagawa M. (1995). Estimation of genetic effects of a static magnetic field by a somatic cell test using mutagen-sensitive mutants of Drosophila melanogaster. Bioelectochem. and Bioen. 36: 95-100.

Kowalczuk C.I., Robbins L., Thomas J.M., Saunders R.D. (1996). Dominant lethal studies in male mice after exposure to 50 Hz magnetic field. Mutat. Res. 328: 229-237.

Lambert B., Hansson K., Lindsten J., Sten M. and Werelius B. (1976). Bromodeoxyuridine. induced sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. Hereditas. 82:163-174.

Latt S.A. (1981). Sister-chromatid exchange formation. Genetic. Rev. 15: 11-55.

Liburdy R.P. (1992). Calcium signaling in Lymphocytes and ELF Fields, evidence for an electric field metric and asite of interaction involving the calcium ion channel. Fed of Europ. Biochem Societies, 30: 53-59.

Lichtman A.H., Segel G.B. and Lichtman M.A. (1983). The role of calcium in Lymphocyte proliferation (an interpretative review) Blood 61: 413-422.

Lisker R. y Armendares S. (1994). Introducción a la Genética Humana. Editorial Manual Moderno. Primera edición. pp 16-18.

Maimon M., Cohen A.K., Astemborski J.A. and McCulloch D. (1986). The effect of low–level 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells. II sister–chromatid exchange in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cells. Mutat. Res. 172: 171-184.

Mc Cann J., Dietrich F. and Rafferty Ch. (1998). The genotoxic potential of electric and magnetic fields an update. Mutat. Res. 411: 45-86.

Metcal F.J.C., Moore J.P., Smith G.A. and Hesketh T.R. (1986). Calcium and cell proliferation. British Med . Bull. 42: 405-412.

Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M. and Hunger-Ford D.A. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20: 613-616.

Nordenson I., Mild K.H., Anderson G. and Sandstroom M. (1994). Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermitent exposure to fifty hertz magnetic fields. Bioelectromagnetics. 15: 293-301.

Perry P. and Evans H.J. (1975). Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature. 258: 121-125.

Raposa T. (1978). SCE studies for monitoring DNA damage and repair capacity after citostatic *in vitro* and *in vivo* lymphocyte of leukaemia patients under cytostatic therapy. Mutat. Res. 53:241-251.

Rojas E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P. (1992). Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproductible endpoints in genetic toxicology testing?. Mutat. Res. 282:283-286.

Rosenthal M. and Obe G. (1989). Effects of 50 Hertz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripherial lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. Mutat. Res. 210:329-325.

Salamanca F. (1990). Citogenética Humana. Primera edición. Editorial Panamericana. pp 27-30, 58-60.

Scarff M.R. and Franceschetti. (1991). Micronuclei formation in human lymphocytes exposed to 50 Hz AC electric fields. Electromag. in Biol. and Med. 27:159-162.

Scarfi M.R., Lioi M.B., Zeni O., Dellanoce M., Franceschi B. and Bersani F. (1999). Micronucleus Frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields. Health, phys. 76: 244-250.

Steka D. and Wolff S. (1976). SCE as an assay for genetic damage induce by mutagen-carcinogens. II *In vitro* test for compounds requiering metabolic activation. Mutat. Res. 41:343-350.

Sutherland G.R., Baker E., Saeshadri R.S. and Black A. (1980). Increased sister chromatid exchange in multiple sclerosis. New Eng. J. Med. 303:1126-1129.

Synder C.A. and Valle G. (1991). Lymphocyte proliferation assays as potencial biomarkers for toxicant exposures. J. Toxicol. Environ. Health, 34, 127-139.

Tabrah F.L., Mower H.F., Batkin S. and Grenwood P.B. (1994). Enhanced Mutagenic Effect of a 60 Hz time-varying magnetic field on numbers of azide-induced TA100 revertant colonies. Bioelectromagnetics 15:85-93.

Thompson J.S. y Thompson M.W. (1968). Genética Médica. Editorial Salvat Primera Edición. pp 6-11.

Tofani S., Ferrara A., Anglesio L., Gilli G. (1995). Evidence for genotoxic effects of resonant ELF magnetic fields. Bioelectochem. Bioener. 36: 9-13.

Valijus J., Norppa H., Jarventaus H., Sorsa M., Nykyri E., Salomaa S., Jarvinen P., Kajander J. (1993). Analysis of chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei among power linesmen with long-term exposure to 50 Hz electromagnetic fields. Journal. Radiat. Environ. Biophys. 32: 325-336.

Wolff S., Bodycote J. and Painetr R.B. (1974). Sister Cromatid exchanges induce in Chinese hamster cell by U.V. radiation of different stages of the cell cycle: the necessity for cell to pass through S. Mutat. Res. 25:73-81.

Wolff S. (1977). Sister chromatid exchange. Ann. Rev. Genet. 11:183-201.

Zwingelberg R., Obe G., Mevissen M., Buntenkotter S., Loscher W. (1993). Exposure of rats to 50 Hz, 30 mT magnetic field influences neither the frquencies of sister chromatid exchanges nor proliferation characteristics of cultured peripherial lymphocytes. Mutat. Res. 302: 39-44.

CAPITULO III

Efecto de Campos Electromagnéticos (CEM) de 60Hz sobre parámetros hematológicos de ratón (*Mus musculus)* Línea BALB/c *in vivo*

ANTECEDENTES

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos sobre diversos parámetros hemáticos de ratones expuestos a campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) *in vivo*.

Debido a que el tejido sanguíneo es un indicador eficaz del estado fisiológico de un mamífero superior, incluyendo al ser humano, se han descrito muchos parámetros medibles en la sangre, por lo cual este tejido ha sido frecuentemente utilizado como modelo de estudio para evaluar el efecto de diferentes factores, desde deficiencias nutricionales, hasta la influencia del estrés y diversas sustancias químicas derivadas de exposición ocupacional o producto de la contaminación ambiental (Baez-Villaseñor, 1961; Bloom-Fawcett, 1988).

Asimismo, el tejido sanguíneo se ha utilizado para estimar el efecto de factores físicos tales como las radiaciones ionizantes (Casarett, 1968).

CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO SANGUÍNEO

La sangre consiste en una matriz líquida llamada plasma y una gran variedad de células que desempeñan funciones tales como el transporte de oxígeno y bióxido de carbono, inmunológica y distribución de nutrientes, además juegan un papel esencial en la función integradora del sitema endócrino. Estas células sanguíneas conocidas también como elementos formes de la sangre, se hayan representadas por diversos tipos entre los que se cuentan los siguientes (Sánchez-Yllades, 1992; William-Banks, 1995):

Eritrocitos: La eliminación de su núcleo y su forma bicóncava, garantiza que los glóbulos rojos tengan capacidad máxima para transportar oxígeno.