Neutrófilos: Son los granulocitos que se encuentran con mayor frecuencia. Son células que se aproximan al doble del tamaño de los glóbulos rojos y tienen el núcleo segmentado con 3 a 5 lóbulos unidos por filamentos de cromatina.

Eosinófilos: Constituyen el segundo grupo de granulocitos que se encuentra con mayor frecuencia, su núcleo es bilobulado, pero puede ser polimorfo y los granulos acidófilos grandes y alargados en el citoplasma como característica distintiva.

Basófilos: Son los menos numerosos de los granulocitos, tienen mas o menos el mismo tamaño que los neutrófilos con núcleo bilobulado se caracterizan por que los gránulos se tiñen más oscuros que el núcleo y generalmente suelen ocultarlo.

Linfocitos: Son los agranulocitos que se encuentran con mayor frecuencia. Su núcleo siempre es esférico, tiene heterocromatina condensada en su periferia con un núcleo muy denso.

Monocitos: Son las células sanguíneas de mayor tamaño, su núcleo tiene forma de riñón, pero puede ser esférico o trilobulado. La cromatina es más clara y reticulada que la del núcleo de los linfocitos. Por lo general el citoplasma es grisáceo, pero la presencia de granulaciones distribuidas de manera uniforme le confiere el aspecto de vidrio despulido.

Plaquetas: Son pequeños discos que constituyen fragmentos citoplásmicos de los megacariocitos unidos a las membranas que contienen una región basófila central y otra periférica pálida y homogénea.

Efectos de los CEM en sangre

Las células sanguíneas, en especial los linfocitos, han sido usados como un modelo de gran importancia para estudiar los efectos biológicos de CEM debido a su gran radiosensibilidad (Cadossi et al., 1992).

Durante la segunda guerra mundial se estudiaron los efectos de los CEM emitidos por radares y radios de alta frecuencia sobre la sangre de trabajadores expuestos a estos aparatos, el análisis de los resultados mostró un incremento en el conteo de células blancas (Marino et al., 1977).

Cossarizza et al. (1989) por su parte, estudiaron el efecto producido por los CEM de frecuencia extremadamente baja sobre la proliferación de linfocitos humanos periféricos de personas jóvenes y de edad avanzada. La exposición al campo electromagnético fue durante un periodo de 3 días . Se encontró que el efecto fue mayor sobre los individuos de edad avanzada, ya que se observó una acentuada reducción de la capacidad proliferativa.

Con el objeto de evaluar la producción sinérgica de efectos clastogénicos por radiación ionizante y campos magnéticos de 60 Hz, se realizaron experimentos usando linfocitos humanos de sangre periférica. Después de la exposición a radiación ionizante, las células fueron cultivadas con CEM de 60 Hz y de 1.4 μT. Se encontró que las células expuestas a radiación ionizante y CEM de 60 Hz mostraban una elevada frecuencia de complementos cromosómicos tetraploides, característica no observada cuando son expuestas únicamente a radiación ionizante (Hintenlang, 1993).

Estudios citológicos muestran que al aplicar CEM de rangos milimétricos en ratones durante una hora, estimula la eritropoyésis e induce cambios en el número de linfocitos en sangre ; la reacción del sistema biológico a estos campos depende de la zona de irradiación y el estado inicial del animal y en base a esto se concluyó que el efecto de dichos CEM provoca

una combinación de cambios locales y generales, pero todavía está en discusión tanto el mecanismo de acción en el organismo, como el nivel del efecto y su trascendencia (Didenko et al., 1986).

En un estudio realizado en ratas Wistar macho expuestas a CEM pulsados a una intensidad de 20 mT, 2.5 horas por un día y una exposición crónica por 6 horas durante 30 días a una intensidad de 0.1 mT, se encontraron cambios en la tiroides y glándulas sexuales, también se encontró una linfopenia y disminución de los eosinofilos (Zagoroskaia, 1990).

Por otro lado, se realizó un estudio *in vivo* para estudiar los efectos de la exposición prolongada a los CEM de 50-60 Hz en leucocitos de ratones Swiss. La fuerza promedio del campo magnético fue de 5 μT. El grupo control fue colocado en una habitación donde la fuerza del campo estuvo siempre por debajo de 0.1 μT. Los parámetros hematológicos fueron medidos cada 3 semanas. El análisis de diferencias se hizo a los días 0, 20, 43, 90 y 190. Al día 20, el recuento de leucocitos fue más bajo para el grupo expuesto, y se observó un descenso significativo para linfocitos y monocitos. No se registraron diferencias al día 43. Sin embargo, a los 90, días el recuento de linfocitos, neutrófilos y eosinófilos fue significativamente más bajo en el grupo expuesto que en el grupo control. A los 190 días también fue observada la neutropenia (Bonhomme-Faivre et al., 1994).

Por otra parte, hay estudios epidemiológicos que mencionan la relación entre la exposición a los CEM con las leucemias y desordenes del sistema inmune (Werheimer y Leper, 1979). Sin embargo Selmaoui et al. (1996), realizarón un estudio con 32 hombres jovenes entre los 20 y 30 años de edad donde 16 sujetos fungieron como un grupo control no expuestos y los 16 restantes fueron expuestos a CEM de 10 μT por intervalos de 1 hora. Se estudiaron los parámetros de hematocrito, conteo de eritrocitos, total de

leucocitos y variables inmunológicas (CD3, CD4, CD8, NK y células B) no encontrando resultados significativos.

Por otro lado, un estudio realizado en ratas para investigar el efecto a largo plazo de los CEM de 50 Hz a una intensidad magnética de 30 mT en periodos de 7 a 28 días sobre la proliferación celular de linfocitos en sangre periférica, mostró que éstos campos no tienen efecto alguno sobre los parámetros estudiados (Zwingelberg et al., 1993).

Con la finalidad de asociar la exposición a largo plazo a CEM de baja intensidad, se realizó un estudio donde se expusieron ratas macho albinas de 12 semanas de edad por 22 horas diarias durante 32 semanas a una dosis de 5 μT, fueron evaluados los parámetros hematológicos sin encontrar cambios en éstos (Margonato et al., 1995).

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio experimental acerca del efecto del estrés y de los campos magnéticos sobre parámetros hemáticos *in vivo* utilizando ratas Wistar. Se encontró que el estres produce elevaciones generalizadas de los elementos formes de la sangre y una disminución en las proteínas totales plasmáticas. Sin embargo en los animales sometidos a CEM, no apareció este efecto (Valderrama-Zurian, 1997).

Asimismo, Ubeda et al. (1997) trataron *in vivo* ratas Wistar con CEM a una intensidad de 1.5 mT y no encontraron cambios significativos en comparación con un grupo no expuesto, en lo que respecta a células sanguíneas y proteínas plasmáticas. Sin embargo mencionan que es necesario llevar a cabo más estudios al respecto para así establecer conclusiones sólidas.

En otro estudio experimental donde se midieron los cambios hematológicos y bioquímicos en ratones de 6 semanas de edad expuestos durante 350 días a CEM con una intensidad de 5.0 μT, producidos por transformadores y líneas de alta tensión utilizadas para autobuses eléctricos, se encontró que a los 20 días de

exposición se disminuían significativamente los eritrocitos, linfocitos y monocitos, y que la hemoglobina y el hematocrito se incrementaban en comparación con animales no expuestos. Entre los 43 y 63 días de exposición no se encontraron diferencias significativas en comparación con el testigo negativo. A los 90 días se encontró una disminución significativa en linfocitos neutrófilos polimorfonucleares y eosinófilos en comparación con el testigo negativo, a los 190 días se encontró un descenso en el cortisol y a los 350 días no se encontraron diferencias en los parámetros estudiados (Bonhomme-Faivre, 1998-a).

Un estudio realizado en 13 trabajadores que se encontraban expuestos a transformadores de alta tensión que generaban CEM de 0.2 μT a 6.6 μT de intensidad magnética por un periodo de 8 horas diarias durante 1 a 5 años, mostró que tales individuos presentaron desordenes físicos y emocionales tales como fatiga, disminución de la libido, tendencia a la depresión e irritabilidad. Además los individuos estudiados presentaron una disminución importante en el total de linfocitos, CD4, CD3 y CD2, así como un incremento en células NK, leucopenia y neutropenia en comparación con personas que no se encontraban expuestas a campo magnético (Bonhomme-Faivre et al., 1998-b).

Por su parte, este mismo grupo de investigadores en un estudio más reciente (Bonhomme-Faivre et al., 1999) mostraron que los parámetros hematológicos pueden ser modificados por campos magnéticos. En un estudio crónico con CEM a intensidades de 0.03 μT y 0.8 μT por un periodo de hasta 160 días en ratones Swiss de 4 semanas de edad se encontró que a los 21 días de exposición los eritrocitos y la hemoglobina se incrementaban significativamente en comparación con el testigo, al día 56 los neutrofilos y monocitos descendían con respecto al testigo y al día 106 los neutrofilos y monocitos se encontraron

bajos en comparación con animales no expuestos. Estos resultados sugieren el potencial efecto de los CEM sobre los parametros hematológicos.

Efecto de Campos Eléctricos en Parámetros Hemáticos

Existe una gran diversidad de estudios que han investigado el efecto de campos eléctricos en los parámetros hematológicos de mamíferos. En esta sub-sección se decidió incluir algunos de los más relevantes por la relación que éstos tienen con los estudios de campos magnéticos previamente mencionados.

Desde los años 60 se ha estudiado formalmente el efecto de campos eléctricos en el tejido sanguíneo así, por ejemplo en un estudio realizado con ratones expuestos a campos eléctricos de 157 kV/m durante 1500 horas en el que se midieron los neutrófilos, los leucocitos y proteínas en el plasma, se encontró que éstos parámetros no sufrieron cambios por causa de la exposición (Knickerbocker et al., 1967).

Por otro lado Meda et al. (1972) realizaron un estudio para evaluar los posibles efectos de los campos eléctricos de 10 kV/m sobre las células blancas de la sangre de ratas expuestas en forma aguda por 6 horas, mostrando que los eosinófilos y los neutrófilos se incrementaban y que los linfocitos disminuían considerablemente en comparación con un grupo de animales no expuesto.

En un estudio con ratones, hecho para evaluar los efectos de los campos eléctricos de 50 Hz de frecuencia a una intensidad de 10 kV/m sobre los parámetros sanguíneos, se expusieron animales por un período crónico de 55 días y se encontró que los eosinófilos y los neutrófilos se incrementaban en comparación con un grupo no expuesto, mientras que los linfocitos disminuían por influencia del campo aplicado (Blanchi et al., 1973).

Por otro lado, una investigación realizada en ratas utilizando campos eléctricos de 50 Hz con una intensidad de 0.1-5 Kv/m por 4 meses, detectó una

disminución de los eosinófilos, así como también una elevación de la glucosa en sangre periférica (Dumarsky et al., 1976).

En otro estudio experimental para ver los efectos de los campos eléctricos en ratas y conejos Le Bars y Andre (1976) colocaron los animales exponiéndolos al campo por un período de entre 100 - 300 días a una intensidad de 50 kV/m y encontraron que los eritrocitos, los reticulocitos, los neutrófilos y los linfocitos no se veían afectados, solo las proteínas plasmáticas se vieron incrementadas por dicho campo.

En otro trabajo realizado en ratas expuestas durante un periodo de un año a campos eléctricos de 100 kV/m se encontró que estos afectaban a los leucocitos mostrando una considerable disminución de éstos en comparación con el testigo no expuesto (Bayer et al., 1977).

Otros experimentos realizados con ratas expuestas a campos eléctricos de 50 Hz a una intensidad de 15 kV/m durante 30 días mostraron un incremento de algunas proteínas del plasma con respecto a los controles (Marino et al., 1977).

En ese mismo año se publicaron los resultados de un experimento realizado con ratones, los cuales fueron expuestos a campos eléctricos de 50 Hz con una intensidad de 25-50 kV/m durante 6 semanas, éstos mostraron cambios en algunos parámetros sanguíneos como un aumento significativo de los leucocitos, corticosteroides y algunas de las proteínas del plasma, así como también una disminución de los eritrocitos (Poznaiak et al., 1977).

En otro estudio realizado para evaluar el efecto de los campos eléctricos de 50 Hz a una intensidad de 100 kV/m en linfocitos de ratas, los animales se expusieron al campo 8 horas diarias durante 2 meses y se encontró que los linfocitos se incrementaban durante el período de exposición (Cerretelli et al., 1979).

[redacted]

Sin embargo en otro trabajo muy relacionado con el anterior, se evaluaron los efectos de estos campos eléctricos de 50 Hz a una intensidad de 100 kV/m sobre los parámetros sanguíneos de ratas durante un período de exposición de 60 días no mostró cambios en los eritrocitos y proteínas plasmáticas mientras que los neutrófilos se incrementaron considerablemente en comparación con el testigo negativo y por otro lado los linfocitos se vieron disminuidos (Malaguti et al., 1980).

Por otro lado se llevó a cabo un estudio con grupos de ratones hembra y macho para evaluar los efectos de los campos eléctricos sobre eritrocitos, leucocitos y proteínas del plasma; sometiéndolos a un campo eléctrico de 50 Hz con 240 kV/m de intensidad durante un período de 22 horas diarias entre 83 - 188 días. Los resultados mostraron que tanto los eritrocitos como los leucocitos en los ratones hembra se vieron notoriamente disminuidos y que en el caso de los ratones macho, las proteínas plasmáticas en especial la albúmina se vieron incrementadas (Fam, 1980).

En un estudio efectuado para evaluar los efectos de los campos eléctricos de 50 Hz a una intensidad de 5 kV/m sobre los eritrocitos, fueron expuestos grupos de ratones por un período de 2 días encontrándose que los eritrocitos se veían disminuidos en comparación con animales no expuestos (Marino et al., 1980).

Según Ragan et al. (1983) numerosos estudios sobre los efectos de los campos eléctricos sobre la sangre periférica no arrojan resultados significativos. Se replicaron algunos experimentos utilizando campos eléctricos de 60 Hz a una intensidad de 100 KV/m de exposición que oscilaban entre los 15 y 120 días de exposición y al ser replicados dichos experimentos y ser sometidos a rigurosas pruebas estadísticas se concluyó que estos campos no inducen cambios sobre la sangre periférica de los organismos

expuestos en comparación con sus testigos negativos no expuestos. Se menciona la necesidad de realizar los experimentos en condiciones altamente controladas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los CEM oscilantes de 60 Hz son capaces de modificar los parámetros sanguíneos de ratones (*Mus musculus*) de la línea BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de CEM oscilantes de 60 Hz sobre parámetros hematológicos de ratones (*Mus musculus*) de la línea BALB/c expuestos *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

A) Evaluar el efecto de los CEM oscilantes de 60 Hz en intensidades de 1.0, 1.5, y 2.0 mT por un período de 72 h sobre los parámetros hematológicos de ratones *Mus musculus* línea BALB/c expuestos *in vivo*.

B) Evaluar el efecto de los CEM oscilantes de 60 Hz a una intensidad de 2.0 mT combinado con Mitomicina-C (5 mg/kg) por un período de 72 h sobre los parámetros hematológicos de ratones *Mus musculus* línea BALB/c expuestos *in vivo*.

C) Evaluar el efecto de los CEM oscilantes de 60 Hz a una intensidad de 2.0 mT por un período de 10 días/8 h diarias sobre los parámetros hematológicos de ratones *Mus musculus* línea BALB/c expuestos *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo se utilizaron ratones (*Mus musculus*) macho de tres meses de edad de la línea BALB/c proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina,U.A.N.L.

EXPOSICIÓN DE LOS ANIMALES A LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS

Los ratones usados para el tratamiento magnético fueron colocados en el interior de un solenoide como el que se especifica en el Capítulo I de esta tesis y que corresponde al modelo de exposición *in vivo*. Las intensidades magnéticas aplicadas fueron; 1.0, 1.5 y 2.0 mT.

PRUEBAS SANGUÍNEAS

Se realizaron pruebas hematológicas al inicio y al final del tratamiento con la finalidad de comparar las variaciones. La toma de la muestra se realizó por vía periorbital (cavidad ocular) tomando la muestra por la mañana y a la misma hora, usando capilares de vidrio heparinizado para la toma de las mismas. Con la finalidad de evitar infecciones que pudieran interferir en los resultados, a los ratones se les aplicó Cloranfenicol oftálmico en solución, al ojo del animal antes y después de la extracción de sangre. Las pruebas hematológicas a realizar fueron:

a) **microhematocrito (Htc)**.- Que expresa el porcentaje de glóbulos rojos por volumen de sangre total, se realizó llenando 2 capilares heparinizados de ½ a ¾ partes, sellándose con un tapón de creatoseal por el extremo donde se realizó el llenado. Los capilares fueron

centrifugados con una microcentrífuga (marca Sol-bat modelo PI.16) a 11000 r.p.m., por espacio de 5 minutos. Utilizando un lector para microhematocrito se determinó su lectura correspondiente (Blaxhall y Daisely, 1973).

b) **Proteína total del plasma (PP).**- Para determinar éste parámetro se utilizaron los capilares centrifugados para la prueba del microhematocrito, los cuales fueron seccionados, tomando solamente la porción del plasma, el cual se colocó en un refractómetro (modelo A 300 CL) para determinar por gravimetría la proteína del plasma, haciendo la lectura en la escala con unidades g/dl.

c) **Hemoglobina (Hb).**- Para medir la cantidad de hemoglobina se utilizó un hemoglobinómetro marca BMS, para esto se colocó una gota de sangre (0.1 ml) en la cámara, se hemolizó la sangre con un aplicador (marca Cida) que contiene saponina (200 mg. aprox.), se colocó la cámara en su compartimento. Se observó por el ocular deslizando el indicador de la escala hasta igualar los colores de la pantalla, se tomó la lectura en la escala con unidades g/dl.

d) **Concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH).**- Esta es la concentración media de hemoglobina en un volumen determinado de concentración de eritrocitos. Se calcula a partir de la concentración de hemoglobina y del hematocrito como lo indica la siguiente fórmula:

CCMH=Hb(g/dl) / H t c, y se expresa en g/dl.

e) **Recuento diferencial de leucocitos.**- Que determina el número relativo de cada tipo de leucocitos presentes en la sangre (Lynch, 1972). El recuento diferencial se realizó usando un frotis de sangre teñido con hemocolorante

rápido (marca Hycel de México S.A. de C.V.). Se colocó una gota de sangre en uno de los extremos del portaobjetos y con otro portaobjetos formando un ángulo de 40 grados aproximadamente, se desliza hacia el extremo opuesto del portaobjetos que inicialmente tenía la sangre, secado al aire y posteriormente fijado con metanol por espacio de 30 min, se coloreó con hemocolorante por espacio de 15 a 20 seg en la solución 1 enjuagando con agua y eliminando el exceso de ésta para ser colocado el mismo lapso de tiempo en la solución 2, se lavaron y secaron al aire y una vez terminado este proceso el frotis se observó bajo un microscopio marca Carl Zeizz con objetivo de inmersión (100X), deslizando el frotis para revisar diferentes campos, hasta contar cien células blancas. Para determinar la proporción de cada una de ellas se contabilizaron; neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron cinco experimentos independientes utilizando un diseño preexperimental, es decir, los ratones fueron sangrados al inicio y al final del experimento. Los resultados obtenidos antes y después, se analizaron estadísticamente. Los experimentos fueron llevados a cabo de la siguiente manera:

Experimento No.1.- Tratamiento con CEM de intensidad 1.0 mT
Por un período de 72 hrs.

Experimento No.2.- Tratamiento con CEM de intensidad 1.5 mT
Por un período de 72 hrs.

Experimento No.3.- Tratamiento con CEM de intensidad 2.0 mT
Por un período de 72 hrs.

Experimento No.4.- Tratamiento combinado con Mitomicina-C 10^{-7}M más CEM de intensidad 2.0 mT. Por un período de 72 hrs.

Experimento No.5.- Exposición fraccionada con CEM de intensidad 2.0 mT por un período de 10 días 8 h diarias.

Para cada uno de los experimentos 1, 2, 3 y 4 se utilizaron tres animales, y se compararon con un testigo negativo el cual no se expuso al factor físico ni al químico, y un testigo positivo al cual se le suministraron intraperitonealmente 5 mg de Mitomicina-C por cada kilogramo de peso del animal. En total por cada experimento se utilizaron nueve ratones. En el caso del experimento 5 solo contó con el testigo negativo ya que no se pudo obtener una dosis que fuera fraccionada y causara el mismo efecto que la dosis única utilizada en los demás experimentos.

Los ratones que se expusieron en el sistema fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos a una temperatura entre los 25-28 ^{o}C.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño antes y después utilizado en el presente trabajo permitió incrementar la capacidad de detectar diferencias estadísticas, donde la variabilidad de los resultados fuera menor que la variabilidad intratratamientos, al utilizar la información en pareamiento (es decir, que cada animal es su propio testigo) se eliminan fuentes de varianza extraña que puedan intervenir con los resultados (Steel y Torrie, 1985).

Los datos se analizaron mediante pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas. Se aplicó inicialmente a los datos la prueba de Kolmogorov-Smirnov que determina si la distribución de los datos era normal o no. En el

caso de los eosinófilos y basófilos que mostraron una distribución normal se analizaron por medio de una "prueba de t" para dos muestras relacionadas, el resto de las variables se analizaron mediante la prueba no paramétrica de contrastes de Wilcoxon.

Dichos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software para Windows 95 SPSS versión 8.0 de acuerdo a Ferrán-Aranaz (1996).

RESULTADOS

EXPERIMENTO No. 1 Exposición de ratones a CEM de 60 Hz a 1.0 mT / 72 h contínuas.

En la Tabla III.1 se muestran los resultados obtenidos en este experimento donde se encontró en el caso del tratamiento magnético un incremento en los neutrófilos y monocitos mientras que los linfocitos y la CCMH se vieron disminuidos ($P<0.05$). Aunque otras variables en el tratamiento mostraron diferencias estadísticas significativas no se considera que el factor haya sido la causa del cambio ya que el testigo negativo mostró la misma diferencia. Por su parte el grupo tratado con Mitomicina-C (testigo +) manifestó los mismos efectos que el tratamiento magnético en los neutrófilos y linfocitos pero no en los monocitos ni en la CCMH.

EXPERIMENTO No.2 Exposición de ratones a CEM de 60 Hz a 1.5 mT / 72 h contínuas.

En la Tabla III.2 se muestran los resultados encontrados para este experimento, donde se observó que el tratamiento magnético a una intensidad de 1.5 mT por un período de 72 horas contínuas de exposición produjo un incremento de la CCMH y los neutrófilos asi como una disminución en los linfocitos ($p < 0.05$), el resto de las variables no mostraron alteraciones.

EXPERIMENTO No.3 Exposición de ratones a CEM de 60 Hz a 2.0 mT / 72 h contínuas.

En la tabla III.3 se muestran los resultados para este experimento en el caso del tratamiento a 2.0 mT por un período agudo de 72 horas se encontró

que la PP y los linfocitos disminuyen mientras que los neutrófilos se incrementan ($p < 0.05$). Los demás parámetros hematológicos no mostraron modificaciones atribuibles al tratamiento magnético. Hasta este experimento, se puede observar que el resultado más consistente es el aumento en los neutrófilos y la disminución de linfocitos que se ha encontrado a las tres intensidades magnéticas aplicadas.

EXPERIMENTO No.4 Exposición de ratones a CEM de 60 Hz a 2.0 mT por 72 h combinado con Mitomicina-C a 5 mg/kg.

En la Tabla III.4 se muestran los resultados correspondientes a este experimento donde se encontró que para el tratamiento se incrementó ($p < 0.05$) la concentración corpuscular media de hemoglobina mientras que en el resto de las variables no mostró diferencia estadísticamente significativa. El grupo tratado con Mitomicina-C (testigo +) mostró sus efectos sobre linfocitos, neutrófilos y monocitos, así como en la hemoglobina, proteína del plasma y concentración corpuscular media de hemoglobina.

EXPERIMENTO No.5 Exposición de ratones a CEM de 60 Hz a 2.0 mT, 8 h diarias / 10 días.

En la Tabla III.5 se muestran los resultados obtenidos en este experimento, donde encontramos que en el caso del tratamiento magnético no mostró diferencia estadísticamente significativa sobre ninguna de las variables estudiadas en comparación con el grupo de animales no expuesto al campo magnético. Es decir, que el campo magnético aplicado de esta manera no modificó los parámetros hemáticos.

PRUEBAS	Experimento N°1: CEM de 60 Hz a 1.0 mT.												
	#REP	X			DESV EST.			P			EST		
		(-)	(+)	1.0 mT	(-)	(+)	1.0 mT	(-)	(+)	1.0 mT	(-)	(+)	1.0 mT
Hb 0 hrs Hb 72 hrs	9	17.33 15.83	17.66 13.88	17.16 16.83	±0.661 ±0.559	±0.567 ±1.219	±0.500 ±0.485	0.007[a]	0.008[a]	0.084	-2.719	-2.67	-1.73
PP 0hrs PP 72 hrs	9	5.53 6.02	3.800 5.440	6.280 7.950	±0.489 ±0.210	±0.477 ±0.371	±0.437 ±0.538	0.018[a]	0.056	0.041[a]	-2.375	-1.914	-2.041
Htc 0 hrs Htc 72 hrs	9	55.33 51.44	55.88 45.44	59.88 50.11	±1.658 ±1.833	±2.571 ±1.130	±3.550 ±3.829	0.008[a]	0.007[a]	0.012[a]	-2.67	-2.675	-2.524
CCMH 0 hrs CCMH 72 hrs	9	3.190 3.250	3.160 3.300	3.490 2.980	±0.104 ±0.158	±0.131 ±0.374	±0.155 ±0.298	0.594	0.374	0.011[a]	-0.534	-0.889	-2.547
NEU 0 hrs NEU 72 hrs	9	36.44 35.22	38.00 71.66	23.11 74.55	±4.186 ±2.438	±7.952 ±9.394	±9.701 ±4.013	0.859	0.008[a]	0.008[a]	-0.178	-2.666	-2.666
EOS 0 hrs ESO 72 hrs	9	0.330 0.220	0.110 0.220	0.000 0.330	±0.050 ±0.044	±0.033 ±0.044	±0.000 ±0.050	0.594[b]	0.594[b]	0.081[b]	0.555[c]	-0.555	-2
BAS 0 hrs BAS 72 hrs	9	0.000 0.110	0.110 0.000	0.000 0.110	±0.000 ±0.333	±0.333 ±0.000	±0.000 ±0.333	0.347[b]	1[b]	0.347[b]	-1	0[c]	-1
LIN 0 hrs LIN 72 hrs	9	61.00 63.33	60.00 27.11	77.44 24.11	±4.000 ±2.549	±7.297 ±8.462	±8.308 ±4.400	0.314	0.008[a]	0.008[a]	-1.007	-2.666	-2.668
MON 0 hrs MON 72 hrs	9	2.110 1.110	1.440 1.000	0.220 1.000	±1.536 ±0.600	±0.726 ±1.224	±0.440 ±0.707	0.084	0.33	0.038[a]	-1.725	-0.973	-2.07

Tabla III.1.- Promedios de los parámetros hematológicos y valores estadísticos obtenidos de ratones *Mus musculus* línea Balb/c expuestos *in vivo* a CEM de 60 Hz y 1.0 mT de intensidad magnética.

Hb= Hemoglobina, PP= Proteína Total en Plasma, Htc= Hematocrito, CCMH= Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina, NEU= Neutrófilos, ESO= Eosinófilos, BAS= Basófilos, LIN= Linfocitos, MON= Monocitos, 0 hrs= Antes del Tratamiento, 72 hrs= Después del Tratamiento, #REP= Número de Repeticiones, $\bar{X}$= Media, DESV EST= Desviación Estandar, P= Probabilidad, Est= Estadístico, (-) = Testigo Negativo, (+) = Testigo Positivo, 1.0 mT= Tratamiento del CEM, a= Significativos Estadísticamente, b= Analizados por pruebas paramétricas.

PRUEBAS	Experimento N°2 CEM de 60 Hz a 1.5mT.												
	#REP	X			DESV EST.			P			Est		
		(-)	(+)	1.5 mT	(-)	(+)	1.5 mT	(-)	(+)	1.5 mT	(-)	(+)	1.5 mT
Hb 0 hrs Hb 72 hrs	9	17.33 15.83	17.66 13.88	18.39 14.80	±0.661 ±0.559	±0.567 ±1.219	±0.416 ±1.563	0.007[a]	0.008[a]	0.008[a]	-2.719	-2.67	-2.67
PP 0hrs PP 72 hrs	9	5.53 6.02	3.800 5.440	5.870 6.067	±0.489 ±0.210	±0.477 ±0.371	±0.244 ±0.223	0.018[a]	0.056	0.041[a]	-2.375	-1.914	-2.047
Htc 0 hrs Htc 72 hrs	9	55.33 51.44	55.88 45.44	55.33 51.20	±1.658 ±1.833	±2.571 ±1.130	±3.122 ±1.418	0.008[a]	0.007[a]	0.015[a]	-2.67	-2.675	-2.433
CCMH 0 hrs CCMH 72 hrs	9	3.190 3.250	3.160 3.300	3.010 3.500	±0.104 ±0.158	±0.131 ±0.374	±0.216 ±0.366	0.594	0.374	0.0.08[a]	-0.534	-0.889	-2.666
NEU 0 hrs NEU 72 hrs	9	36.44 35.22	38.00 71.66	25.70 67.56	±4.186 ±2.438	±7.952 ±9.394	±8.366 ±9.988	0.859	0.008[a]	0.008[a]	-0.178	-2.666	-2.666
EOS 0 hrs ESO 72 hrs	9	0.330 0.220	0.110 0.220	0.660 0.220	±0.500 ±0.440	±0.333 ±0.440	±0.707 ±0.440	0.594[b]	0.594[b]	0.195[b]	0.555	-0.555	1.414
BAS 0 hrs BAS 72 hrs	9	0.000 0.110	0.110 0.000	0.000 0.220	±0.000 ±0.333	±0.333 ±0.000	±0.000 ±0.440	0.347[b]	1[b]	0.347[b]	-1	0	-1
LIN 0 hrs LIN 72 hrs	9	61.00 63.33	60.00 27.11	71.20 30.11	±4.000 ±2.549	±7.297 ±8.462	±6.418 ±9.993	0.314	0.008[a]	0.008[a]	-1.007	-2.666	-2.666
MON 0 hrs MON 72 hrs	9	2.110 1.110	1.440 1.000	2.000 1.660	±1.536 ±0.600	±0.726 ±1.224	±1.224 ±1.224	0.084	0.33	0.831	-1.725	-0.973	-0.213

Tabla III.2 Promedios de los parámetros hematológicos y valores estadísticos obtenidos de ratones *Mus musculus* Linea Balb / C expuestos *in vivo* a CEM de 1.5 mT de intensidad magnética.

Hb= Hemoglobina, PP= Proteína Total en Plasma, Htc= Hematocrito, CCMH= Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina, NEU= Neutrófilos, ESO= Eosinófilos, BAS= Basófilos, LIN= Linfocitos, MON= Monocitos, 0 hrs= Antes del Tratamiento, 72 hrs= Después del Tratamiento, #REP= Número de Repeticiones, $\overline{X}$= Media, DESV EST= Desviación Estandar, P= Probabilidad, Est= Estadístico, (-) = Testigo Negativo, (+) = Testigo Positivo, 1.5 mT= Tratamiento del CEM, a= Significativos Estadisticamente, b= Analizados por pruebas paramétricas.

PRUEBAS	Experimento N°3 CEM 60 Hz a 2.0 mT.												
	#REP	X			DESV EST.			P			Z	Est	
		(-)	(+)	2.0 mT	(-)	(+)	2.0 mT	(-)	(+)	2.0 mT	(-)	(+)	2.0 mT
Hb 0 hrs Hb 72 hrs	9	17.92 16.42	17.92 15.00	19.58 15.17	±1.111 ±1.023	±0.484 ±1.858	±0.353 ±1.038	0.023[a]	0.011[a]	0.007[a]	-2.271	-2.556	-2.68
PP 0hrs PP 72 hrs	9	6.650 6.700	6.700 1.050	7.383 7.150	±0.714 ±0.456	±0.367 ±0.414	±0.109 ±0.334	0.722	0.21[a]	0.031[a]	-0.356	-2.313	-2.154
Htc 0 hrs Htc 72 hrs	9	55.50 47.00	51.5 44.17	57.67 46.00	±2.000 ±2.437	±2.264 ±5.906	±2.165 ±7.404	0.008[a]	0.007[a]	0.008[a]	-2.666	-2.675	-2.666
CCMH 0 hrs CCMH 72 hrs	9	3.110 2.880	2.870 3.000	2.940 3.050	±0.195 ±0.295	±0.118 ±0.635	±0.101 ±0.530	0.051	0.859	0.441	-1.955	-0.178	-0.77
NEU 0 hrs NEU 72 hrs	9	13.00 21.89	8.440 36.56	26.11 55.22	±5.545 ±9.253	±4.187 ±19.11	±4.285 ±8.526	0.066	0.015[a]	0.008[a]	-1.836	-2.429	-2.666
EOS 0 hrs ESO 72 hrs	9	0.333 0.111	0.222 0.111	0.111 0.111	±0.707 ±0.333	±0.441 ±0.333	±0.333 ±0.333	0.447[b]	0.347[b]	1[b]	0.8	1	0
BAS 0 hrs BAS 72 hrs	9	00.00 0.111	00.00 00.00	00.00 00.00	±00.00 ±0.333	±00.00 ±00.00	±00.00 ±00.00	0.347[b]	1[b]	1[b]	-1	0	0
LIN 0 hrs LIN 72 hrs	9	85.56 77.56	90.33 62.89	90.33 62.89	±5.102 ±8.791	±4.555 ±19.11	±4.157 ±8.526	0.51	0.015[a]	0.008[a]	-1.955	-2.429	-2.668
MON 0 hrs MON 72 hrs	9	1.111 0.444	1.000 0.444	1.000 0.444	±0.781 ±0.527	±0.707 ±0.527	±0.500 ±0.500	0.81[b]	0.51[b]	1[b]	2	2.294	0

Tabla III.3.–Promedios de los parámetros hematológicos y valores estadísticos obtenidos de ratones *Mus musculus* línea Balb/c expuestos *in vivo* a CEM de 2.0 mT.

Hb = Hemoglobina, PP = Proteína Total en Plasma, Htc = Hematocrito, CCMH = Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina, NEU = Neutrófilos, ESO = Eosinófilos, BAS = Basófilos, LIN = Linfocitos, MON = Monocitos, 0 hrs = Antes del tratamiento, 72 hrs = Después del tratamiento, #REP = Número de Repeticiones, $\bar{X}$ = Media, DESV EST = Desviación Estándar, P = Probabilidad, Est = Estadístico, (-) = Testigo Negativo, (+) = Testigo Positivo, 2.0 mT = Tratamiento del CEM, a = Significativos Estadísticamente, b = Analizados por pruebas paramétricas.

PRUEBAS	Experimento N°4 CEM de 60 Hz a 2.0 mT +MMC.												
	#REP	X			DESV EST.			P			EST		
		(-)	(+)	2.0 mT + M.C.	(-)	(+)	2.0 mT + M.C.	(-)	(+)	2.0 mT + M.C.	(-)	(+)	2.0 mT + M.C.
Hb 0 hrs Hb 72 hrs	9	16.78 15.72	16.33 14.44	17.61 16.83	±1.481 ±1.121	±0.968 ±1.210	±0.820 ±2.092	0.141	0.012[a]	0.203	-1.474	-2.524	-1.272
PP 0hrs PP 72 hrs	9	6.889 6.800	6.378 5.678	6.567 6.400	±0.372 ±0.218	±0.205 ±0.424	±0.324 ±0.320	0.635	0.012[a]	0.307	-0.475	-2.527	-1.022
Htc 0 hrs Htc 72 hrs	9	51.33 45.44	49.67 46.78	53.44 57.89	±1.732 ±1.569	±1.936 ±3.701	±1.333 ±5.578	0.008[a]	0.144	0.066	-2.67	-1.461	-1.84
CCMH 0 hrs CCMH 72 hrs	9	3.170 2.900	3.050 3.240	3.040 3.470	±0.222 ±0.243	±0.200 ±0.185	±0.150 ±0.355	0.173	0.05[a]	0.021[a]	-1.362	-1.956	-2.31
NEU 0 hrs NEU 72 hrs	9	28.11 21.11	23.33 57.67	20.44 22.67	±10.26 ±10.71	±4.950 ±8.276	±5.593 ±9.798	0.008[a]	0.008[a]	0.008[a]	-2.666	-2.666	-2.666
EOS 0 hrs ESO 72 hrs	9	0.222 0.111	0.333 00.00	0.222 00.00	±0.441 ±0.333	±0.500 ±00.00	±0.441 ±00.00	0.594[b]	0.081[b]	0.169[b]	0.555	2	1.512
BAS 0 hrs BAS 72 hrs	9	00.00 0.111	00.00 00.00	00.00 00.00	±00.00 ±0.333	±00.00 ±00.00	±00.00 ±00.00	0.347[b]	1[b]	1[b]	-1	0	[illegible]
LIN 0 hrs LIN 72 hrs	9	70.33 77.89	74.78 41.56	77.78 76.22	±10.14 ±10.73	±5.118 ±8.172	±5.911 ±9.497	0.26	0.008[a]	0.594	-1.125	-2.666	-0.533
MON 0 hrs MON 72 hrs	9	1.222 1.111	1.556 0.777	1.333 1.111	±0.666 ±0.782	±0.527 ±0.667	±0.866 ±0.601	0.799[b]	0.023[ab]	0.512[b]	0.263	2.8	0.686

Tabla III.4.- Promedios de los parámetros hematológicos y valores estadísticos obtenidos de ratones *Mus musculus* línea Balb/c expuestos *in vivo* a CEM de 2.0 mT + MMC.

Hb= Hemoglobina, PP= Proteína Total en Plasma, Htc= Hematocrito, CCMH= Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina, NEU= Neutrófilos, ESO= Eosinófilos, BAS= Basófilos, LIN= Linfocitos, MON= Monocitos, 0 hrs= Antes del Tratamiento, 72 hrs= Después del Tratamiento, #REP= Número de Repeticiones, $\bar{X}$= Media, DESV EST= Desviación Estandar, P= Probabilidad, Est= Estadístico, (-) = Testigo Negativo, (+) = Testigo Positivo, 2.0 mT + MMC= Tratamiento del CEM, a= Significativos Estadísticamente, b= Analizados por pruebas paramétricas.

PRUEBAS	Experimento N°5 CEM 60 Hz exposición fraccionada.								
	#REP.	X		DESV EST.		P		EST	
		(-)	CRONICO	(-)	CRONICO	(-)	CRONICO	(-)	CRONICO
Hb 0 hrs	9	15.89	16.06	±1.244	±0.464	0.36	0.287	-0.916	-1.065
Hb 80 hrs		15.33	15.78	±0.559	±0.755				
PP 0hrs	9	6.111	6.567	±0.621	±0.543	0.008[a]	0.018[a]	-2.668	-2.366
PP 72 hrs		7.767	7.622	±0.510	±1.151				
Htc 0 hrs	9	50.67	51.22	±1.581	±0.972	0.007[a]	0.012[a]	-2.675	-2.524
Htc 80 hrs		53.89	53.89	±1.537	±1.269				
CCMH 0 hrs	9	3.200	3.190	±0.181	±0.089	0.028[a]	0.021[a]	-2.194	-2.31
CCMH 80 hrs		3.520	3.420	±0.218	±0.188				
NEU 0 hrs	9	31.44	21.89	±3.779	±8.695	0.086	0.051	-1.718	-1.955
NEU 80 hrs		47.56	31.44	±23.72	±6.560				
EOS 0 hrs	9	0.111	00.00	±0.333	±00.00	1[b]	0.347[b]	0	-1
ESO 80 hrs		0.111	0.111	±0.333	±0.333				
BAS 0 hrs	9	00.00	00.00	±00.00	±00.00	0.347[b]	1[b]	-1	0
BAS 80 hrs		0.111	00.00	±0.333	±00.00				
LIN 0 hrs	9	67.67	76.67	±3.873	±8.775	0.139	0.066	-1.481	-1.836
LIN 80 hrs		55.33	66.67	±23.23	±6.000				
MON 0 hrs	9	0.778	1.444	±0.971	±1.130	0.088	0.438	-1.709	-0.776
MON 80 hrs		1.88	0.444	±1.054	±0.726				

Tabla III.5 Promedios de los parámetros hematológicos y valores estadísticos obtenidos de ratones *Mus musculus* línea Balb/c expuestos *in vivo* a CEM de 2.0 mT por un periodo fracionado.

Hb= Hemoglobina, PP= Proteína Total en Plasma, Htc= Hematocrito, CCMH= Concentración Corpuscular Media de Hemoglobina, NEU= Neutrófilos, ESO= Eosinófilos, BAS= Basófilos, LIN= Linfocitos, MON= Monocitos, 0 hrs= Antes del Tratamiento, 72 hrs= Después del Tratamiento, #REP= Número de Repeticiones, $\bar{X}$= Media, DESV EST= Desviación Estandar, P= Probabilidad, Est= Estadístico, (-) = Testigo Negativo, (+) = Testigo Positivo, CRONICO= Tratamiento del CEM, a= Significativos Estadísticamente, b= Analizados por pruebas paramétricas.

DISCUSION

En el presente estudio se encontró evidencia de que los CEM de 60 Hz son capaces de modificar algunos de los parámetros hematológicos de los ratones *Mus musculus* línea Balb/c *in vivo*.

En el caso de la hemoglobina no se encontró cambio entre los grupos expuestos a las intensidades de 1.0 mT, 1.5 mT, 2.0 mT, 2.0 mT + M.M.C y 2.0 mT durante 10 días 8 hrs diarias con respecto al grupo testigo (-). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en otras investigaciones, (Margonato et al., 1995 ; Bonhome-Faivre et al., 1999), aunque ellos expusieron los animales a CEM de 5 μT durante períodos prolongados no encontrando diferencia entre los grupos expuestos a la radiación comparados con el grupo testigo (-). Sin embargo, en un estudio reciente Bonhome-Faivre et al. (1999) expusieron ratones a intensidades de 0.03 y 0.8 μT durante un período de 160 días y encontraron un incremento en la concentración de hemoglobina.

Asimismo, en el presente estudio, se encontró que no había alteraciones en la concentración de la proteína total del plasma al ser expuestos los ratones a las intensidades 1.0, 1.5, al tratamiento combinado de 2.0 mT + MMC y el tratamiento fraccionado de 2.0 mT. Sin embargo, se observó un incremento en los valores de la proteína total del plasma en el tratamiento agudo de 2.0 mT. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con otros trabajos en los cuales utilizaron CEM menores de 1.5 mT para evaluar el efecto sobre este parámetro en ratones y en los cuales no se encontró influencia del CEM en la concentración de la proteína total del plasma (Margonato et al., 1995; Valderrama, 1997; Ubeda et al., 1997). Por otra parte, Le Bars y Andre (1976)

encontraron un incremento en la concentración de la proteina total del plasma en ratas al ser expuestas a campos eléctricos de 50 kV/m.

En cuanto a los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los CEM sobre la concentración del hematocrito, éste no mostró diferencia estadísticamente significativa en los experimentos a 1.0, 1.5, 2.0 mT, tratamiento combinado y fraccionado con respecto a los testigos (-). Estos resultados son similares a los obtenidos por Margonato et. al. (1995), sin embargo, ellos expusieron ratas a una intensidad de 5 μT durante 12 semanas y no encontraron diferencia entre el grupo tratado con dicha radiación y el grupo control. Por otra parte se ha evaluado el efecto de los CEM en el ser humano y en ratones y no se han encontrado efectos sobre la concentración del hematocrito (Selmaoui et al., 1996; Bonhome-Faivre et al., 1998-a).

Tampoco se encontró diferencia en la CCMH del grupo expuesto a 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia y el grupo crónico comparado con su respectivo testigo (-). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Margonato et al. (1995). Sin embargo, se encontró efecto a las intensidades de 1.0 mT, 1.5 mT así como en el tratamiento combinado de CEM y MMC.

Por otro lado, se encontró que la exposición aguda de CEM a 1.0, 1.5 y 2.0 mT de 60 Hz de frecuencia provoca un incremento en el número de neutrófilos circulantes en sangre, siendo este uno de los resultados más consistentes en esta investigación. Estos hallazgos concuerdan con aquellos de otros investigadores; los cuales determinaron cual era el efecto de los CEM sobre tejido hemático de ratones y encontraron diferencias entre los grupos expuestos a CEM y los grupos no expuestos a dicho factor ((Malaguti et al., 1980; Blanchi et al., 1973; Poznaniak et al., 1977). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticas en los grupos combinados y crónicos (exposición fraccionada) comparados con los grupos

testigo. Estos resultados tienen similitud a los obtenidos por Bonhome-Faivre et al. (1998-a), quienes expusieron ratones a CEM de 5 μT durante 365 días no encontrando alteraciones en los neutrófilos. Por otra parte Selmaoui et al. (1996) evaluó el efecto de los CEM de 10 μT en seres humanos no encontrando diferencias en estas células entre los individuos expuestos a CEM y los individuos del grupo testigo.

No se encontró efecto de los CEM en ninguno de los tratamientos aplicados sobre el número de eosinófilos. Estos resultados confirman lo observado por otros investigadores (Margonato et al., 1995; Valderrama-Zuriel, 1997; Ubeda et al., 1997; Bonhome-Faivre et al., 1998-a) quienes tampoco obtuvieron efecto de los CEM sobre este parámetro. Sin embargo, en otros estudios se han revelado efectos de los CEM sobre eosinófilos observándose una disminución de los mismos (Bonhome-Faivre et al., 1988-b; Zagoroskaia, 1990).

Resultados similares se obtuvieron con basófilos ya que no se encontraron diferencias entre los grupos tratados con CEM y los grupos testigo. Lo cual concuerda con Ubeda et al. (1997) quienes expusieron ratas a un CEM de 1.5 mT no obteniendo cambios en el número de basófilos circulantes en sangre. Otros trabajos igualmente demuestran que los CEM no tienen efectos sobre basófilos (Marino et al., 1977; Margonato et al., 1995; Bonhome-Faivre et al., 1998-a), sin embargo las intensidades fueron menores a las utilizadas en la presente investigación.

Por otra parte se observó que el número de linfocitos disminuía en los animales expuestos a intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 mT. Esto concuerda con varios trabajos presentados (Meda et al., 1976; Bayer et al., 1977; Malaguti et al., 1980; Blanchi et al., 1973; Cossarizza et al., 1989; Bonhome-Faivre et al., 1998-b; Zagoroskaia, 1990). Como en el caso de los neutrófilos mencionados

anteriormente, esta alteración en los linfocitos fue observada en todas las intensidades magnéticas aplicadas.

Una gran cantidad de estudios indican que los CEM similares a los utilizados en esta investigación son capaces de provocar efectos sobre el metabolismo de la célula, dando alteraciones en la síntesis de DNA, RNA y proteínas. Algunos de los efectos que se han observado a nivel celular son: supresión de la proliferación de linfocitos T y alteración de componentes de la membrana (Adey, 1981).

Por otra parte, no se encontró efecto combinado de los CEM y la MMC sobre linfocitos de ratón. Se sabe que el efecto principal del mutágeno MMC es a nivel del DNA y además es inhibidor de la división celular (Matter y Granwiler, 1975) y por su parte los CEM tienen como sitio principal de acción a la membrana celular (Liburdy, 1992). Sin embargo, si se ha informado de efectos de los CEM sobre el DNA, al menos en forma indirecta (Goodman y Blank, 1997).

En cuanto al tratamiento crónico de CEM sobre linfocitos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con CEM y el grupo control. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Le Bars y Andre (1976); quienes expusieron ratas a CEM durante un período de 300 días no encontrando alteraciones en los grupos expuestos a CEM. Además, hay que tomar en cuenta los mecanismos de reparación, pues los animales pasaron 16 horas sin exponerse al campo y en este tiempo bien podrían revertirse algunos efectos citotóxicos provocados por los campos magnéticos (Cadossi et al., 1992).

Finalmente, y en lo que respecta al efecto de los CEM sobre el número de monocitos, se encontró que solamente el grupo expuesto a la intensidad de 1.0 mT fue el que presentó un incremento significativo en estas células. Este

aumento en el número de monocitos fue obtenido también por Poznaniak et al. (1977) al exponer ratones a CEM por 6 semanas encontrando un aumento en el número de monocitos comparado con el grupo control, además de un aumento en la concentración de corticosteroides.

CONCLUSIONES

Los CEM de 1.0 mT de 60 Hz aplicados por 72 h provocaron incrementos en el porcentaje de neutrófilos y monocitos en sangre, así como una disminución en la CCMH y linfocitos en ratones *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo*.

Los CEM de 1.5 mT de 60 Hz aplicados por 72 h provocaron un incremento en los valores de CCMH y porciento de neutrófilos en sangre además de una disminución de linfocitos de ratones *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo*.

Los CEM de 2.0 mT de 60 Hz aplicados por 72 h provocaron un incremento de neutrófilos y una disminución de poteína total del plasma y linfocitos de ratones *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo*.

Los CEM de 2.0 mT de 60 Hz aplicados por 72 h en combinación con MMC (5mg/kg) incrementaron los valores de CCMH de ratones *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo*.

La exposición a CEM de 2.0 mT de 60 Hz por un periodo diario de 8 horas por 10 días consecutivos no provocaron alteraciones en los parámetros hematológicos de ratones *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo*.

LITERATURA CITADA

Adey N.R. (1981). Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields. Physiol. Rev. 61: 435-437.

Baez-Villaseñor L. (1961). Hematología Clínica. Ediciones de Hospital de Enfermedades de la Nutrición. Primera edición. México. pp.17-19.

Bayer A. Brinkman J, and Wittke G. (1977). Experimenta research on rats for determining the efeect of electrical ac fields on living beings. Elektrizitaetswirtschaft. 76 :77-81.

Blanchi D., Cedrini L., Ceria F., Meda E. and Re, GG. (1973). Exposure of mammalians to strong 50 Hz electric fields. I. Effects on the proportion of the different leukocyte types. Arch. Fisiol. 70 :30-32.

Blaxhall, P.C. and Daisely. (1973). Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish. Biol. Vol.5. pp:771-781.

Bloom-Fawcet D.W. (1988). Tratado de Histología. McGraw-Hill Interamericana 12ª. Edición. pp. 44-46.

Bonhomme-Faivre L., Bizi E., Marion S., Bezie Y., Rudant E., Auclair H. and Orbach-Arbouys S. (1994). Hematology of mice exposed to enviromental 50-Hz, 5 μT magnetic fields. Environ. Pathol. and Toxicol. 37: 5564-5568.

Bonhomme-Faivre L. Mace A, Bezie Y, Marion S, Bindoula G, Szekely A.M. Frenois N., Auclair H., Orbach-Arbouys S. and Bizi E. (1998-a). Alterations of biological parameters in mice chroniclly exposed to low-frecuency (50 Hz) electromagnetic fields. Life Sci. 62:1271-80.

Bonhomme-Faivre L., Marion S., Bezie Y., Auclair H., Fredj G. and Hommeau C. (1998-b). Study of human neurovegetetive and hematologic effects of enviromental low-frecuency (50 Hz) electromegnetic fields produced by transformers. Arch. Environ. Health. 53 :2. 87-92.

Bonhomme-Faivre L., Santini R., Marion S., Bizi E., Auclair H., Bottius L., Orbach-Arbouys S. and Bui N.L. (1999). Hematological effects of television emittcd-radiation in mice : a parallel study with a protective equipment. Bioelectromagnetics. poster A1. International Meeting of Biological effects of magnetic and electric fields. N.Y. USA.

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

Casarett A.P. (1968). Radiation Biology. Prentice-Hall. First Edition. USA. pp. 12-18.

Cerretelli P, Veicsteinas A., Margonato V, Cantone A., Viola D., Malaguti C., and Previ A. (1979). 100 kV project: Research on the biological effects of 50 Hz electric fields in Italy. CONF-781016. Springfield : NTIS, pp 241-257.

Cossarizza A., Monti D., Bersani F., Canitini M., Cadossi R., Sacchi A. and C. Franceschi C. (1989). Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in limphocytes from young and agedsubjects. Biochem. and Biophys. Res. Comun. 160:692-698.

Didenko N.P., Perel'muter V.M., Gurevich M.E., Rzhevskaia Z.I. and Cha V.A. (1986). Effect of electromagnetic fields of a milimeter range on the blood system of animals depending upon their initial state and the zone of irradiation. Biofizika 31: 882-885.

Dumarsky Y.D., Popovich V.M. and Prokhvatilo Y.V. (1976). Hygienic evaluation of an electromagnetic field generated by high-voltage electric power transmission lines. Gig. Sanit. 8 :19-23.

Fam W.Z. (1980). Long-term biological effects of very intenese 60-Hz electric field on mice. IEEE Trans Biomed Eng BME-27 :376-381.

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

Goodman R. and Blank M. (1997). Do electromagnetic fields interact directly with DNA?. Bioelectromagnetics 18: 111-115.

Hintenlang D.E. (1993). Synergistic effects of ionizing radiation and 60 Hz. magnetic fields. Bioelectromagnetics, 14:545-510.

Knickerbocker G., Kouwenhoven W.B. and Barnes H. (1967). Exposure of mice to a strong ac electric field-An experimental study. IEEE Trans power Appar Syst Pas 86 :498-505.

Le Bars H. and Andre G. (1976). Biological effects of an electric field on rats and rabbits. Jurnal of Gen. Electr. (special issue) 12: 91-97.

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 chanel. Fed of Europ. Biochem. Societies. 30: 53-59.

Lynch A. (1972). Métodos de laboratorio, Editorial Interamericana, 2ª edición, pp 34-70.

Malaguti C., Previ A., Cantone A., Cerreteli P. and Veicsteina A. (1980). Biological effects of exposure to electrical fields at 50-Hz. Proceedings Assiciazionne Electrotecnici de Electronici Italiano. Trieste. Italy.

Margonato V., Nicolini P., Conti R., Zecca L., Veicsteinas A. and Cerretelli P. (1995). Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats: II. 50 Hz magnetic fields.Bioelectromagnetics. 16: 343-55.

Marino A.A., Berger T.J., Austin B.P., Becker R.O. and Hart, F.X. (1977). *in vivo* bioelectrochemical changes associated with exposure to extremely low frequency electric fields. Physiol. Chem. Phys. 9 :433-441.

Marino A.A., Berger T.J., Austin B.P., Becker R.O. and Hrt F.X. (1980). Sensitivity to change in electrical enviroment : A new bioelectric effect. Am J. Physiol. 239 :R424-R427.

Matter B.E. and Granwiler J. (1975). The micronucleus test as a simple model, *in vivo* for the evaluation of drug-induced chromosome aberrations: comparative studies with thirteen compounds. Mutat. Res. 29:198-199.

Meda E., Carrescia V. and Cappa S. (1972). Experimental results from exposure of animals to ac electric fields in: "Second international colloquium on the prevention of ocupational risks due to electricity". Cologne, Germany. Nov. 30 to Dec. 1.

Poznaiak D.T., Graves H.B. and McKee G.W. (1977). Biological effects of hig-intensity 60-Hz electric on the growth and development of plants and animals. J Microwave Power. 12 :41-42.

Ragan H.A., Buschbom R.L., Pipes M.J., Phillips R.D. and Kaune W.T. (1983). Hematologic and serum chemestry studies in rats exposed to 60 Hz electric fields. Bioelectromagnetics 4: 79-90.

Sánchez-Yllades L. (1992). Hematología topográfica, su importancia en la patología clínica. Salvat. 1ª edición. p.p.1-7.

Selmaoui B., Bogdan A., Auzeby A., Lambrozo J. and Touitou Y. (1996). Acute exposure to 50 Hz magnetic field does not affect hematologic or immunologic functions in healthy young men: a circadian study. Bioelectromagnetics 17: 364-372.

Steel R.G. y Torrie J.H. (1985), Bioestadística. Principios y fundamentos, Editorial Mc Graw-Hill, México, pp520-539.

Ubeda A., Diaz-Enriquez M., Martinez-Pascual M.A. and Parreno A. (1997). Hematological changes in rats exposed to weak electromagnetic fields. Life Sci. 61:1651-1656.

Valderrama-Zurian L. (1997). Aportaciones al conocimiento de los efectos de los campos magnéticos de baja intensidad y frecuencia sobre bioquímica hemática en el stress experimental y su repercusión sobre la glándula suprarrenal. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga. España.

Wertheimer N. and Leper E. (1979). Electrical wiring configurations and childhood cancer. Am. J. Epidemiol. 109:273-284.

William-Banks J. (1995). Histología Veterinaria Aplicada. Editorial el Manual Moderno. Segunda edición. México D.F. pp. 211-243.

Zagoroskaia E.A., (1990). Reaction of the endocrine system and peripherial blood of rats to a single and chronic exposure to pulsed low-frequency electromagnetic field. Kosm. Biol. Aviakosm. Med. 24: 56-60.

Zwingelberg R., Obe G., Mevissen M., Buntenkotter S. and Loscher W. (1993). Exposure of rats to 50 Hz, 30 mT magnetic field influences neither the frecuencies of sister chromatid exchanges or proliferation characteristics of cultured pheripherial lymphocytes. Mutat. Res. 302: 39-44.

CAPÍTULO IV

Evaluación del Efecto Clastogénico de Campos Electromagnéticos de 60 Hz en Células de Médula Ósea de Ratón *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo* Mediante la Prueba de Micronúcleos.

ANTECEDENTES

Como se señaló en el capítulo anterior, ha existido en los últimos años una gran polémica acerca del potencial efecto genotóxico y citotóxico asociado a la exposición a campos electromagnéticos (CEM) de frecuencia extremadamente baja, similares a los que comunmente estamos expuestos.

En este capítulo se presentan los resultados del efecto clastogénico (ruptura del material genético) que un campo magnético puede ejercer en un modelo murino utilizando como blanco a la médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c. Cabe mencionar que un punto fuerte de la polémica en torno al efecto genético de los CEM, radica en el hecho de que éstos tienen una energía tan baja ($\ll$ 10 electrón Volts) que en forma directa no deberían romper la molécula de DNA (Goodman y Blank, 1997) sin embargo, estos mismos autores sugieren un efecto de los campos magnéticos sobre el DNA ya que la molécula de este ácido posee una conducción electrónica sumamente alta de alrededor de 1.6×10^{-13} coulombs / seg , lo cual podría verse afectado por la influencia de un CEM. Asimismo, previamente se había informado que el DNA puede curvarse cuando las cargas en un segmento de una de sus cadenas son neutralizadas y en sí esto originaría, inestabilidad (Strauss y Maber, 1994).

A continuación se presenta el marco teórico que corresponde a la prueba que se eligió para tratar de demostrar si hay algún efecto de los campos magnéticos en la ruptura de DNA, esta es la llamada prueba de micronúcleos.

Fundamento de la Técnica de Micronúcleos

Los micronúcleos (MN) son cuerpos redondeados de origen nuclear encontrados en el citoplasma, fuera del núcleo principal. Se asemejan al

núcleo en forma y propiedades de tinción y pueden variar ampliamente en tamaño. Se originan de fragmentos acéntricos, los cuales han sido excluídos del núcleo hijo durante la división celular; pueden ser también formados por cromosomas enteros que se rezagaron durante las divisiones celulares precedentes debido a que no se unieron al huso acromático (Rooney y Czepulkowski, 1992).

Los micronúcleos, también conocidos por mucho tiempo por los hematólogos como los cuerpos de Howell-Jolly, se identificaron en los eritrocitos policromáticos (EPC) que quedaban después de la expulsión del núcleo principal, pero que aún conservan gran cantidad de ácido ribonucléico, lo que hace que adquieran una tonalidad azul al ser teñidos con el colorante de Wrigth, contrastando con el color rojizo de los eritrocitos normocromáticos (ENC). Esta observación, dio origen a la llamada prueba de micronúcleos, al observar estos como la alteración principal en médula ósea de hámsters tratados con un agente mutagénico (Boller y Schmid, 1970; Schmid, 1970; Schmid, 1975). La simplicidad de la técnica, su fácil determinación y adecuada sensibilidad la hicieron una prueba muy valiosa en ensayos de mutagenicidad habiendo sido primero establecida en médula ósea de roedores y posteriormente ampliándose a linfocitos humanos (Rooney y Czepulkowski, 1992). Asimismo, los EPC expresados en porcentaje de aparición con respecto a los ENC, son un buen indicador del tiempo requerido para que una célula eritropoiética nucleada pierda el núcleo y se convierta en un EPC y con esto evaluar la maduración y división de las células eritrocíticas (Vijayalaxmi et al., 1999).

Micronúcleos y Campos Magnéticos

Una de las primeras investigaciones que trató de evaluar genotoxicidad producto de un efecto clastogénico ocasionado por los campos electromagnéticos es aquella llevada a cabo por Nordenson et al. (1984) que al medir daños en el material genético de 20 trabajadores de línea eléctricas; *in vivo* observaron un incremento significativo en rupturas cromosómicas comparado con el grupo control, pero, al exponer linfocitos en cultivo de sangre periférica a 50 Hz con 1 mA/cm^2, se encontró que no se inducía ningún daño al material genético.

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Nordenson et al. (1988), para evaluar aberraciones cromosómicas y células micronucleadas en 38 trabajadores de una subestación eléctrica, se observó que al ser comparadas con un grupo control, los trabajadores expuestos presentaron un incremento significativo en aberraciones cromosómicas y células con MN.

De la misma manera, en otro estudio El Nahas y Oraby (1989), encontraron un incremento de los MN en médula ósea de ratones expuestos a campos eléctricos de frecuencia baja y éste incremento mostró dependencia de la dosis de campo aplicado.

Shimizu et al. (1991) reportan un incremento en la frecuencia de MN en células de mamíferos pretratadas con fluoruro de sodio y expuestas *in vitro* a campos magnéticos estáticos de 0.15 a 1.0 T con respecto a aquellas que solo fueron expuestas al fluoruro de sodio.

Sin embargo, Scarfi et al. (1991) informan que al comparar cultivos de linfocitos humanos de 16 donadores sanos se observó que el grupo expuesto a un campo magnético pulsante de frecuencia extremadamente baja presentó una frecuencia de MN similar a la del grupo control, asimismo un grupo expuesto al campo pulsante y con el mutágeno químico Mitomicina-C (MMC)

no resultó afectado en la frecuencia de MN inducidos por el fármaco en comparación con un grupo sin exposición al campo pero con el mutágeno.

Un análisis hecho por Valjus et al. (1993) a 27 trabajadores no fumadores de líneas eléctricas con una considerable exposición a CEM de 50 Hz y 27 no fumadores instaladores de líneas telefónicas como grupo de referencia, mostró que no hubo diferencias en cuanto a formación de cromátidas hermanas, índices de replicación o MN, pero el rango principal de linfocitos con ruptura en las cromátidas fue más alto entre los hombres expuestos que entre los del grupo de referencia.

En otro estudio Scarfi et al. (1993), utilizaron linfocitos humanos de 33 donadores sanos, y demostraron que la exposición a 50 Hz de CEM sinusoidales sobre un amplio rango de intensidades (0.15-10 kV/m en aire) no aumentaba la frecuencia espontánea de MN. Además, estos campos no afectan las mutaciones por MMC, sugiriendo que no producían ningún efecto sinérgico o antagónico.

Por otro lado, Scarfi et al. (1994) expusieron cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica a un campo magnético pulsante de 50 Hz, buscando evaluar el efecto genotóxico con la inducción de MN, inducción de aberraciones cromosómicas e índice mitótico, y observaron que no hay efectos genotóxicos ni incremento en el índice mitótico en los cultivos expuestos comparados con el grupo control.

En otro estudio hecho por Tofani et al. (1995) se encontró que la exposición de linfocitos humanos a campos de 140 μT a 50 Hz o a campos de 75 ó 150 μT a 32 Hz, con el campo geomagnético anulado no mostraban un incremento en la formación de MN; la exposición al campo tampoco afectó a la genotoxicidad inducida por drogas. Asimismo, cuando no se anulaba el

campo geomagnético (42 μT en paralelo al campo AC), no se observó un incremento significativo de células micronucleadas.

Al evaluar la frecuencia de MN inducida por MMC en células de hámster chino CHL/IU bajo el efecto de un campo magnético estático (CME) de 4.7 T *in vitro*, se observó una disminución significativa en el grupo expuesto al CME cada 6 hrs en células micronucleadas inducidas con MMC, estimada en los cultivos a las 18, 42, 54 y 66 hrs. La frecuencia más alta de células MN por MMC fue observada en los cultivos con un tiempo de 42 hrs y disminuyó gradualmente de la misma forma en el expuesto al CME así como en el control (Okonogi et al., 1996).

Por otra parte, pruebas realizadas por Scarfi et al. (1997) indican que campos pulsados de 1300 μT de intensidad a 100 Hz incrementaron la formación de MN en linfocitos humanos expuestos durante 72 h.

En un estudio más reciente de Simkó et al. (1998) se observó que al estudiar la inducción de MN en células de fluido amniótico (CFA) humano *in vitro* expuestas continuamente a un campo magnético de frecuencia extremadamente baja (50 Hz y 1 mT) y a la vez, tratar de comparar la eficiencia de dos sistemas de exposición a diferentes tiempos (Bobina Helmholtz y Bobina Merrit), así como también comparar el efecto de la orientación del campo magnético con respecto a la superficie del medio de cultivo; encontraron que: hubo un incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo control en frecuencia de MN en las células expuestas después de 72 h en exposición vertical en la Bobina Merrit, este mismo efecto no se logró establecer después de la exposición en la Bobina Helmholtz. Sin embargo, después de 24, 48 y 72 h ocurre el aumento en MN al tomar una geometría de exposición horizontal en la Bobina Helmholtz en comparación con los controles y, por otro lado, en la Bobina Merrit no se inducen efectos

genotóxicos con dicha exposición horizontal. Por otra parte, utilizando el químico N-acetil.p-aminofenol como inhibidor de los mecanismos de reparación de DNA no se observó en las CFA un incremento en la frecuencia de MN después de la exposición magnética. Por lo tanto, se concluye que el campo electromagnético no está estrictamente relacionado con mecanismos clastogénicos que inducen la formación de MN.

Recientemente, un grupo de investigadores estudiaron la inducción de MN así como la proliferación celular en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, expuestos a un campo magnético sinusoidal de 50 Hz por 72 h a intensidades de 0.05 mT y concluyeron que no se encontró un efecto genotóxico a las densidades de flujo magnético utilizadas, pero, por otro lado, el índice de proliferación celular se considera afectado significativamente en todas las intensidades utilizadas (Scarfi et al. 1999).

Han resultado interesantes los estudios realizados no solo con campos electromagnéticos de 60 Hz, sino también frecuencias mayores como el llevado a cabo por Vijayalaxmi et al. (1999) con ratones expuestos a radiación electromagnética de banda ultra amplia (REMBUA), tratando de evaluar la frecuencia de MN en médula ósea en EPC, sin encontrar una diferencia en el porcentaje de EPC con respecto al control, asimismo, no observaron un aumento en la frecuencia de MN en el grupo expuesto con respecto al control, por lo cual, concluyen que no hay efecto genotóxico en células de médula ósea de ratones expuestos a REMBUA.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia son potencialmente capaces de producir efectos genotóxicos y citotóxicos en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los campos electromagnéticos oscilantes de 60 Hz de frecuencia a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0 mT en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto genotóxico de los CEM de 60 Hz de frecuencia a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0 mT a las 72 h de exposición mediante el uso de la prueba de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.
2. Evaluar el efecto genotóxico de una exposición combinada de un CEM de 60 Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0 mT más MMC (5 mg/Kg) a las 72 h de exposición mediante el uso de la prueba de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.
3. Evaluar el efecto genotóxico de los CEM de 60 Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0 mT a los 10 días con 8 h diarias de exposición mediante el uso de la prueba de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.

4.- Evaluar el efecto citotóxico de los CEM de 60 Hz de frecuencia a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0 mT a las 72 h de exposición mediante el % EPC en médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.

5.- Evaluar el efecto citotóxico de una exposición combinada de un CEM de 60 Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0 mT más MMC (5 mg/Kg) a las 72 h de exposición mediante el % EPC en médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.

6.- Evaluar el efecto citotóxico de los CEM de 60 Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0 mT a los 10 días 8 h diarias de exposición mediante el % EPC en médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c.

MATERIAL Y METODO

Material Biológico.

Se utilizaron 54 ratones macho *Mus musculus* Línea BALB/c de entre 10 y 12 semanas de edad procedentes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UANL.

Reactivos.

Medio RPMI (GIBCO), Suero fisiológico (PiSA, Lote 119464), Heparina, Suero Fetal de Ternera (GIBCO), Mitomicina-C (SIGMA): Lote 41F-0239. Se disuelve el frasco de 0.5 grs en 5.0 ml de suero fisiológico estéril para una concentración final de 100 mg/ml , Colorante de Wright 0.3 % (CTR), Solución amortiguadora de Fosfatos pH 6.8 : Na_2HPO_4 0.06 M, 0.852 grs, KH_2PO_4 0.06 M, 0.816 grs., Xilol puro (Baker), Alcohol etílico 70 % (Merck).

Cristalería.

Tubos de vidrio para centrífuga de 15 ml de volumen, Pipetas Pasteur, Pipetas de vidrio de 5 ml., Bulbos de hule para pipeta, Cajas petri desechables, Portaobjetos y cubreobjetos.

Material y equipo quirúrgico.

Estuche de disección, Algodón, Gasas, Jeringas de 100 U para Insulina con aguja (29 x 13 mm, PLASTIPAK), Jeringas de 3 ml (21 x 25 mm, PLASTIPAK).

Equipo de Laboratorio.

Centrífuga DYNAC II Clay Adams No. serie 251086, Microscopio compuesto con objetivo de Inmersión (ZEISS, No. serie 1107J13877).

Diseño Experimental

Las dosis de densidad de flujo magnético utilizadas fueron de: 1.0, 1.5, y 2.0 mT y además de una exposición combinada a un CEM de 2.0 mT más el mutágeno químico Mitomicina-C a una concentración de 5 mg/kg, el tiempo y tipo de exposición fue aguda de 72 hrs, cada uno comparado con un testigo negativo sin exposición a factores físicos o químicos y un testigo positivo tratado con MMC (5 mg/Kg). Asimismo, debido a la importancia en lo referente a exposición laboral a CEM se manejó una exposición fraccionada a una intensidad magnética de 2.0 mT, ya que ésta es considerada una densidad de flujo magnético presente en las subestaciones eléctricas (Benz y cols, 1987), simulando por un periodo de 10 días una exposición de ocho horas diarias de las 8:00 h a las 16:00 h al grupo tratamiento comparando los resultados con un testigo negativo; en este experimento no se utilizó un testigo positivo inductor de micronúcleos para evitar riesgos de muerte por intoxicación crónica a los animales expuestos. Debido a la ya mencionada relevancia de un experimento fraccionado, se realizaron dos replicaciones más de éste para un total de tres a los 6 y 12 meses después de llevar a cabo el primero. Para todos los tratamientos y testigos mencionados se manejaron un mínimo de tres repeticiones.

Tratamiento Magnético de los Animales.

Los animales fueron expuestos a campos electromagnéticos oscilantes de 60 Hz, dentro de un solenoide como el especificado en el capítulo I de esta

investigación, en lo correspondiente al modelo de exposición *in vivo*. Las dosis utilizadas fueron 1.0, 1.5 y 2.0 mT.

Tratamiento del Testigo Positivo.

Se seleccionó el compuesto químico Mitomicina-C como testigo positivo, debido al efecto clastogénico conocido que provoca en eritrocitos de médula ósea (Matter y Granwiler, 1975), la concentración elegida fue la de 5 mg/kg ya que es la de mayor poder de inducción de micronúcleos de acuerdo a Montes de Oca-Luna (1982).

Se procedió a una aplicación única del mutágeno suspendido en suero fisiológico como anteriormente se mencionó, inyectándolo de forma aséptica por vía intraperitoneal y se ajustó de acuerdo al peso de cada animal. La inyección se realizó momentos antes de exponer el grupo tratamiento a la estimulación magnética.

Obtención y procesamiento de médula ósea.

Posterior a la exposición de los grupos, se llevó a cabo la prueba de micronúcleos y la de proliferación celular en EPC de médula ósea, utilizando la técnica clásica de Schmid (1975). Primero se procedió al sacrificio del animal el que se realizó por dislocación cervical, se extrajeron ambos fémures y se colocaron en cajas petri que contenían suero fisiológico y con gasa se retiró el exceso de músculo adherido al hueso. Posterior a esto se cortaron las epífisis de cada hueso femoral, de esta forma quedó a la vista el canal medular. Previo a esto, se preparó un tubo de centrifuga con 3.0 ml de medio RPMI más 10 gotas de heparina, se extrajo 2.0 ml de esta solución con ayuda de una jeringa con aguja, para introducirla al canal medular y extraer por

goteo la médula ósea y recibirla en el tubo de centrífuga. La muestra se suspendió y fue agitada suavemente para evitar coagulación.

Se procedió a centrifugar la muestra por cinco minutos a 1500 rpm, desechándose el sobrenadante y se agregó nuevo medio RPMI repitiéndose la operación tres veces para obtener una separación homogénea de la muestra. Finalmente se agregaron de cuatro a cinco gotas de suero fetal bovino a la pastilla celular y se resuspendió de nuevo. Una gota de la suspensión se colocó en un portaobjetos desengrasado y limpio para llevar a cabo la extensión de la muestra por barrido con ayuda de otro portaobjetos.

Tinción de Laminillas.

Cada portaobjetos con la extensión celular se cubrió en forma horizontal con colorante Wrigth 0.3 % con 1 % de glicerina por un tiempo de 3.5 min. A continuación se añadió la solución amortiguadora de fosfatos sobre el colorante dejándolo reposar por 4.5 min. Se lavó en agua corriente y se secó al aire, posterior a esto se introdujo la laminilla en Xilol puro por 45 seg para aclarar la muestra.

Lectura de Laminillas.

La lectura de las muestras se llevó a cabo en un microscopio compuesto con objetivo de inmersión (100 x) y se contabilizó la frecuencia de micronúcleos en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) considerando la aparición de estos cuerpos. Aparte, se contabilizaron los primeros 1000 eritrocitos vistos bajo el microscopio para obtener el número de EPC y de ENC, para de esta manera expresar el resultado en % EPC.

Análisis Estadístico.

Los resultados de la prueba de micronúcleos y % EPC fueron analizados con la ayuda del paquete de computación SPSS versión 8.0 (Ferrán-Aranaz, 1996). Para el caso de la prueba de MN se obtuvo primero el tipo de distribución que presentaron los datos para cada experimento con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, al no presentar una distribución normal, a dichos datos se les aplicó la prueba no paramétrica de Kruskall-Wallis para establecer si existía diferencia entre los testigos y tratamiento de cada uno de los experimentos. Para los diferentes grupos analizados, aquellos que presentaron diferencias significativas se sometieron a la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para establecer cual grupo marca la diferencia. Para el caso del % EPC, se aplicó la transformación Arcoseno (Zar, 1996) y se convirtieron los resultados a radianes, y con esta transformación los valores tuvieron una distribución normal. A los datos transformados se les aplicó un análisis de varianza para establecer la diferencia entre cada tratamiento para cada experimento.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados del experimento de 1.0 mT de intensidad y 72 h de exposición. Se puede observar que resalta una homogeneidad entre el testigo negativo y el tratamiento ya que éstos no presentaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, el mutágeno químico utilizado como control positivo mantiene el esperado efecto clastogénico induciendo la formación de MN. Se asume que, a esta intensidad magnética no se presentó un efecto genotóxico de los campos electromagnéticos, asimismo, no se observó un cambio en la proliferación celular al evaluarse por medio del % EPC.

Por otro lado, en el experimento de 1.5 mT de intensidad magnética y 72 h de exposición se encontró que al comparar el grupo tratamiento con el testigo negativo se presentaron diferencias significativas entre ellos, asimismo, se observó una diferencia entre el tratamiento y el testigo positivo como se esperaba. Por otra parte, la proliferación celular no se vio afectada ya que en esta variable no se presentaron diferencias al realizar el análisis de los resultados. (Tabla I).

Con respecto al análisis estadístico de los resultados del experimento de 2.0 mT de intensidad y 72 h de exposición denotó una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de micronúcleos entre los grupos testigo y el tratamiento, se observó que este último presentó un número mayor de aparición de estos cuerpos nucleares. Al evaluar la proliferación celular por medio del % EPC, se observó un ligero aumento en el tratamiento expuesto al CEM en relación con el testigo negativo, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla I).

EXPERIMENTO	MEDIA DE LA FRECUENCIA DE MN EN 1000 EPC (± DE)	MEDIA % EPC (± DE)
1.0 mT	2.00 (2.00) b	55.86 (3.97)
Testigo (-)	2.33 (058) b	51.16 (3.23)
Testigo (+)	10.00 (1.73) a	60.23 (7.22)
1.5 mT	5.33 (1.15) a,b	54.06 (6.37)
Testigo (-)	2.43 (0.54) b	52.18 (3.21)
Testigo (+)	11.00 (1.65) a	61.93 (6.98)
2.0 mT	25.33 (3.51) a,b	55.23 (2.22)
Testigo (-)	7.00 (2.65) b	53.76 (2.66)
Testigo (+)	19.67 (2.89) a	57.83 (1.26)
2.0 mT + MMC	8.33 (0.58) b	59.73 (4.80)
Testigo (-)	6.00 (1.73) b	64.73 (3.91)
Testigo (+)	13.00 (3.00) a	56.73 (3.80)

Tabla I. Resultados de la evaluación del efecto genotóxico y citotóxico al exponer a CEM de diferentes intensidades por 72 h eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo* mediante la frecuencia de micronúcleos y % EPC. (a) presenta diferencia significativa con el testigo negativo ($p < 0.05$), (b) presenta diferencia significativa con el testigo positivo ($p < 0.05$)

En lo que concierne al experimento de 2.0 mT de intensidad magnética por 72 h combinado con el mutágeno químico Mitomicina-C se observó un efecto antagónico del mutágeno con el CEM, ya que los animales tratados con los dos factores presentaron un menor índice de frecuencia de MN en comparación con el testigo positivo tratado solamente con el mutágeno y como se esperaba, éste a su vez mostró una diferencia significativa con el testigo negativo ($p < 0.05$). En cuanto a la proliferación celular estimada por el % EPC, no se encontró ninguna diferencia entre los grupos (Tabla I).

Por su parte, la Tabla II muestra los valores promedio de la frecuencia de MN y % EPC de los experimentos fraccionados de 2.0 mT de intensidad magnética durante 10 días con 8 h diarias de exposición. En el primer experimento fraccionado, se observa un aumento en la frecuencia de micronúcleos al comparar los resultados del grupo tratamiento con el grupo testigo negativo. Debido a la ya mencionada importancia de éste tratamiento y a los resultados obtenidos en este primer experimento fraccionado, se replicó el mismo a los 6 meses y a los 12 meses, y se obtuvieron datos que avalan el hallazgo inicial en cuanto a un aumento en la frecuencia de micronúcleos inducida por un CEM de 2.0 mT de densidad de flujo magnético. Por otra parte, no se observó un cambio estadísticamente significativo en la proliferación celular al evaluarla por medio del % EPC en ninguno de los experimentos realizados.

EXPERIMENTO	MEDIA DE LA FRECUENCIA DE MN EN 1000 EPC (+ DE)	MEDIA % EPC (+ DE)
Inicial		
2.0 mT	13.33 (5.03)	54.69 (2.43)
Testigo (-)	4.33 (2.52)	53.67 (6.26)
Replicación a los 6 meses		
2.0 mT	15. 67 (1.53)	61.80 (4.65)
Testigo (-)	5.67 (3.06)	56.20 (6.67)
Replicación a los 12 meses		
2.0 mT	11.00 (1.00)	53.23 (9.22)
Testigo (-)	4.33 (1.53)	59.27 (2.48)

Tabla II.- Resultados iniciales y replicados a los 6 y 12 meses de la evaluación del efecto genotóxico y citotóxico al exponer a CEM de 2.0 mT de intensidad por 10 días 8 h diarias eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c mediante la frecuencia de micronúcleos y % EPC, donde los grupos expuestos al CEM presentan diferencia significativa en comparación a los grupos testigo ($p < 0.05$).

DISCUSION

En general, de acuerdo a los resultados del presente estudio, se observó un aumento en la frecuencia de micronúcleos de médula ósea de ratón inducida por los campos electromagnéticos a intensidades de 2.0 y 1.5 mT a las 72 horas, sin embargo, a la densidad de flujo magnético de 1.0 mT este efecto ya no se presentó. Asimismo, se encontró un efecto antagónico entre un CEM de 2.0 mT y el mutágeno Mitomicina-C. La dosis fraccionada que simula una exposición laboral a los CEM de 2.0 mT con una duración de 10 días y 8 horas diarias de exposición indicó, al igual que a las 72 h, un aumento en la frecuencia de MN. Por otra parte, no se encontró una variación estadísticamente significativa en la proliferación celular estimada por medio del % EPC en ninguno de los casos mencionados.

Los resultados experimentales obtenidos a una intensidad magnética de 1.5 y 2.0 mT concuerdan con los reportados por algunos autores tales como Nordenson et al. (1984 y 1988), El Nahas y Oraby (1989), Shimizu et al. (1991), Scarfi et al. (1997) y Simkó et al. (1998); quienes reportan un aumento en la frecuencia de MN. Es importante mencionar que todas las investigaciones anteriores fueron llevadas a cabo en diferentes tipos celulares, y también existe una variación en el tipo de campo utilizado y su intensidad.

Por el contrario, Scarfi et al. (1993, 1994 y 1999) mencionan que CEM sinusoidales y pulsantes no afectan la frecuencia de MN, esto es ratificado por Tofani et al. (1995) con CEM oscilantes. Las pruebas realizadas por Scarfi et al. (1993 y 1994) se pueden comparar con las hechas por Nordenson et al.

(1984) quienes al igual que ellos realizaron experimentos con cultivos de linfocitos de sangre periférica y sin registrar cambios en la frecuencia de MN. Estos resultados cambian notablemente al realizar las pruebas *in vivo*; de aquí que estas variaciones se interpretaron como diferencias de condiciones al realizar las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Lo mismo ocurre con la investigación hecha por Tofani et al. (1995) en la cual aparte de la condición anterior, también se observó que se utilizó una intensidad de CEM menor (150 μT).

Cabe destacar que en los resultados presentados por Scarfi et al. (1999) no se encontraron efectos genotóxicos de los campos magnéticos al exponer cultivos de linfocitos humanos, al igual que el presente trabajo, a la intensidad magnética de 1.0 mT no se presenta el efecto clastogénico observado en las dosis mayores. El trabajo realizado por ellos utiliza un rango de intensidad magnética de 0.05 á 1.0 mT. Por otra parte, estos autores mencionan un cambio en el la proliferación celular que no se observó en este estudio por medio de la prueba de % EPC.

Otras investigaciones difieren en los resultados observados en la investigación, tal como aquellos obtenidos en la frecuencia de micronúcleos por Vijayalaxmi et al. (1999), sólo que ellos evaluaron el efecto con radiación electromagnética de banda ultra amplia (REMBUA); y esto podría ser explicado por el cambio de energía electromagnética, lo que también se ha observado en otros estudios como el de Prasad et al. (1984) quienes utilizaron resonancia magnética nuclear como fuente de exposición.

En cuanto al efecto antagónico encontrado entre un CEM de 2.0 mT y MMC (5 mg/Kg) se reportan resultados parecidos usando un campo magnético estático (CME) con MMC (Okonogi et al., 1996), donde se expusieron al CME células pretratadas con MMC y con esto se disminuía la frecuencia de aparición de MN en comparación con el grupo que solo tenía

MMC. La diferencia con presente estudio es que aquí los animales fueron expuestos simultáneamente a los dos factores.

En contraste, estudios realizados por Shimizu et al. (1991) mencionan un efecto sinérgico de los CME con el mutágeno químico fluoruro de sodio en la frecuencia de MN en células de mamíferos. Por el contrario, Scarfi et al. (1991 y 1993) no observaron efectos sinérgicos o antagónicos tanto de un campo magnético pulsante como de un CEM y el mutágeno químico MMC. Sin embargo, Heredia-Rojas et al. (2001) al trabajar con linfocitos humanos en cultivo y evaluar proliferación celular a la misma dosis magnética utilizada aquí y combinado con MMC encontraron un efecto antagónico de los CEM con la MMC, esto puede atribuirse a que ocurran cambios fisicoquímicos en la MMC al igual que ocurren con otras moléculas de origen biológico que se encuentran bajo la influencia de un CEM (Mitnik et al., 1995).

En lo que concierne al experimento de exposición fraccionada que simuló condiciones laborales (10 días, 8 h diarias a 2.0 mT) en donde se observó un aumento en la frecuencia de MN, esto concuerda con lo informado por Nordenson et al. (1984 y 1988) en trabajadores de líneas eléctricas. Por el contrario, un análisis realizado por Valjus et al. (1993) menciona no encontrar diferencias en la frecuencia de MN de trabajadores de líneas eléctricas, sin embargo, se reporta que ocurre un rompimiento de cromátides lo cual se vislumbra como una alteración clastogénica atribuida al campo magnético.

Al analizar la proliferación celular bajo estas condiciones por medio del % EPC se encontró que no ocurren cambios estadísticamente significativos, lo cual coincide con lo reportado por Vijayalaxmi et al. (1999) aunque ellos utilizaron REMBUA.

Es importante observar las diferencias encontradas por Simkó et al. (1998) en lo referente a la geometría de exposición a un campo magnético, así

como también el tipo de bobina utilizado para tal fin; ya que este experimento marca una diferencia clara entre cada investigación publicada, por lo cual, debe buscarse la estandarización de los métodos de exposición a CEM, así como el sistema inductor del campo, de esta forma estos investigadores tratan de dar una explicación a la variabilidad de los resultados obtenidos por cada investigador en lo referente al efecto clastogénico de los CEM.

En vista de estos resultados controversiales será necesaria la realización de más estudios al respecto tratando de controlar al máximo las variables experimentales.

CONCLUSIONES

1. La exposición *in vivo* a campos electromagnéticos de 60Hz de frecuencia a 1.5 y 2.0 mT de densidad de flujo magnético durante 72 h produce un efecto genotóxico en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c al evaluarse por medio de la prueba de micronúcleos.

2. Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y 2.0 mT de densidad de flujo magnético a las 72 h tienen un efecto antagónico sobre el efecto genotóxico de la Mitomicina-C en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c al evaluarse por medio de la prueba de micronúcleos.

3. La exposición fraccionada a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y 2.0 mT de densidad de flujo magnético durante un período de 10 días con 8 h diarias de influencia magnética produce un efecto genotóxico en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c al evaluarse por medio de la prueba de micronúcleos.

4. Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y 1.0, 1.5 y 2.0 mT de densidad de flujo magnético no indujeron efecto citotóxico en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c al evaluarse por medio de la prueba de % EPC.

LITERATURA CITADA

Benz D.R., Carsten A.R., Baum J.W. and Kuehner A.V. (1987) Mutagenicity and toxicity of 60 Hz magnetic and electric fields: New York State Power Lines Project. Associates Universities, Inc. Wadsworth Center for Laboratories and Research Albany, NY. pag.3.

Boller K. and Schmid W. (1970) Chemische mutagenese beim sauger, das knochenmark deschinesischen hamsters als *in vivo* test system hamatologische befunde mach behanolung mittenimon. Human Genetik. 2:34-54.

El Nahas S. and Oraby H.A. (1989) Micronuclei formation in somatic cells of mice exposed to 50 Hz electric fields. Environ. and Mol. Mutagen. 13: 107-111.

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

Goodman R. and Blank M. (1997) Do electromagnetic fields interact directly with DNA?. Bioelectromagnetics 18: 111-115.

Heredia-Rojas J.A., Rodríguez de la Fuente A.O., Velazco-Campos M.R., Leal-Garza C.H., Rodríguez-Flores L.E., De la Fuente Cortez B. (2001). Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes *in vitro*. Sister chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate. Bioelectromagnetics 22: 145-149.

Matter B.E. and Grauwiler J. (1975) The micronucleus test as a simple model, *in vivo* for the evaluation of drug-induced chromosome aberrations: comparative studies with thirteen compounds. Mutat. Res. 29: 198-199.

Mitnik L., Heller C., Prost J. and Viovy J.L. (1995) Segregation in DNA

solutions induced by electric fields. Science. 267: 219-222.

Montes de Oca-Luna R. (1982) Micronucleos e intercambio entre cromátides hermanas, como pruebas indicadoras de la acción mutagénica de sustancias químicas. Tesis Inédita. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 60 pp.

Nordenson I., Milt K.H., Nordstrom S., Sweins A. and Birke E. (1984) Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electrics fields: *in vivo* and *in vitro* studies. Radiat. Environ. Biophys. 23:191-201.

Nordenson I., Milt K.H., Ostman U. and Ljunberg H. (1988) Chromosomal effects on lymphocytes of 400 kV substation workers. Radiat. Environ. Biophys. 27: 39-47.

Okonogi H., Nakagawa M. and Tsuji Y. (1996) The effects of a 4,7 tesla static magnetic field on the frequency of micronucleated cells induced by mitomycin C. Tohoku J Exp Med. 180:209-215.

Prasad N., Bushong S.C., Thornby J.I., Bryan R.N., Hazlewood C.F. and Harrell J.E. (1984) Effect of nuclear magnetic resonance on chromosomes of mouse bone marrow cells. Magn. Reson. Imaging. 2: 37-39.

Rooney D.E. and Czepulkowski B.H. (1992) Human cytogenetics. A practical aproach. Vol. II Oxford University Press. N.Y. USA.

Scarfi M.R., Bersani F., Cossarizza A., Monti D., Castellani G., Cadossi R., Franceschetti G. and Franceschi C.(1991) Spontaneous and mitomycin-c induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed magnetic fields. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:194-200.

Scarfi M.R., Bersani F., Cossarizza A., Monti D., Zeni O., Lioi M.B., Franceschetti G., Capri M. and Franceschi C. (1993) 50 Hz AC sinusoidal electric fields do not exert genotoxic effects (micronucleus formation) in human lymphocytes. Radiat. Res. 135: 64-68.

Scarfi M.R., Lioi M.B., Zeni O., Franceschetti G., Franceschi C., and Bersani F. (1994) Lack of chromosomal aberration and micronucleus induction in human lymphocytes exposed to pulsed magnetic fields. Mutat. Res. 306: 129-133.

Scarfi M.R., Lioi M.B., Zeni O., Franceschetti G., Franceschi C. and Bersani F. (1997) Exposure to 100 Hz pulsed magnetic fields increases micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes. Bioelectrochem. Bioenerget. 43:77-81.

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

Schmid W. (1975). The micronucleus test. Mutat. Res. 31:9-15.

Shimizu H., Li J., Suzuki Y. and Seki Y. (1991) The effects of magnetic field on the micronucleus inducibility of sodium fluoride. Mutat. Res. 252:107-110.

Simkó M, Kriehuber R. and Lange S. (1998) Micronucleus formation in human amnion cells after to 50 Hz MF applied horizontally and vertically. Mutat. Res. 418:101-111.

Strauss J.K. and Maher L.J. (1994) DNA bending by assymetric phosphate neutralization. Science 266: 1829-1834.

Tofani S., Ferrara A., Anglesio L. and Gilli G. (1995) Evidence for genotoxic effect of resonant ELF magnetic fields. Bioelectrochem Bioenerg. 36:9-13.

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

Vijayalaxmi R., Seaman L., Belt M.L., Doyle J.M., Mathur S.P. and Prihoda T.J. (1999) Frequency of micronuclei in the blood and bone marrow cells of mice exposed to ultra-wideband electromagnetic radiation. Int J Radiat. Biol. 75:115-120.

CAPÍTULO V

Efecto de Campos Electromagnéticos de 60 Hz en Células espermatogénicas de Ratón (*Mus musculus* Línea CD-1) *in vivo*

ANTECEDENTES

Los estudios sobre el potencial genotóxico o citotóxico de campos electromagnéticos (CEM) se han realizado mayormente en células somáticas (Murphy et al. 1983; Juutilainen y Lang, 1997; McCann et al. 1998), sin embargo las células meióticas son también un buen modelo para el estudio del efecto de estos campos, además de ofrecer información sobre el riesgo reproductivo de los mismos (De Vita et al., 1995; Furuya et al., 1998).

En este capítulo se presentan los resultados acerca del efecto de CEM de 2.0 mT sobre células espermatogénicas de ratones expuestos *in vivo*. Los efectos evaluados incluyeron las aberraciones en cromosomas meióticos de espermatocitos y morfología de espermatozoides.

Las células espermatogénicas como modelo de estudio de agentes genotóxicos.

Las evidencias más directas para detectar agentes ambientales con potencial mutagénico provienen de estudios epidemiológicos. Sin embargo, este tipo de investigaciones son muy costosas y los resultados que se obtienen son retrospectivos; es decir, se observan solamente después que las poblaciones han estado en contacto con un agente determinado. Por esto, desde hace algunos años se han buscado modelos biológicos que *in vivo* ó *in vitro*, sean capaces de predecir el potencial mutagénico de agentes físicos y químicos a los cuales los seres humanos pueden estar expuestos accidental, ocupacional o terapéuticamente (Salazar y Herrera-Montalvo, 1992).

Un buen ejemplo de modelo de estudio adecuado para evaluar agentes mutagénicos es el proceso espermatogénico, el cual está constituido de diferentes etapas caracterizadas por el tipo celular presente. Las

espermatogonias constituyen una población permanente que incluye a su vez una población transitoria formada por las etapas de mayor diferenciación de las células germinales. Las espermatogonias subsecuentemente se transformarán en espermatocitos primarios, los cuales por divisiones meióticas darán origen a los espermatocitos secundarios y espermátides que se diferenciarán finalmente en espermatozoides. (Leonard, 1973). Tanto las espermatogonias como los espermatocitos son los tipos celulares más utilizados para el análisis cromosómico (Adler, 1982).

La observación de cromosomas meióticos en espermatocitos de machos que han sido tratados con agentes mutagénicos es un método simple y demostrativo para probar rutinariamente el potencial mutagénico de diversos factores en células de mamíferos (Leonard, 1973).

Como ya se mencionó anteriormente, durante el proceso espermatogénico la población celular se encuentra en transición hacia fases más diferenciadas, de esta forma las células en un estadío A pasan obligatoriamente a un estadío B, con lo cual progresan a través de la meiosis. El daño a la población celular puede alterar la proporción o tasa a la cual las células pasan de un estadío a otro (Lyon, 1981). El arresto en una fase dada es entonces, indicativo de fallas en la espermatogénesis (Chehval et al., 1977).

Por su parte, la célula espermática madura proporciona una forma rápida y sencilla de cuantificar los efectos de agentes ambientales sobre células germinales (Wyrobeck, 1979). En el ratón, numerosos mutágenos, teratógenos y carcinógenos han demostrado inducir aumentos marcados en la fracción de espermatozoides con anormalidades en la cabeza (Wyrobeck et al., 1975). Al evaluar la relación entre los cambios en la morfología del espermatozoide y la mutagenicidad de diversos agentes, se ha encontrado que la prueba de morfología de espermatozoides es altamente sensible a los

mutágenos de células germinales (Wyrobeck et al., 1983). Evidencias preliminares sugieren que estos cambios pueden ser transmitidos a las siguientes generaciones (Hugengoltz y Bruce, 1983).

Meiosis

La producción de descendencia por medio de la reproducción sexual implica la unión de dos células, cada una con un juego completo de información cromosómica. La duplicación del número cromosómico al momento de la fecundación debe compensarse con una reducción equivalente en el número de cromosomas en un estadío previo a la formación de los gametos. El proceso por medio del cual se reduce el número cromosómico, es decir, las células que se forman contienen solo un miembro de cada par de cromosomas homólogos, recibe el nombre de *meiosis*.

La división celular por medio de meiosis (Karp, 1987)

El preámbulo de la meiosis, como en el caso de cualquier división celular incluye la replicación del DNA. La profase meiótica (Fig. V.1, A-D) es particularmente larga, durando en la mayoría de los mamíferos 3 semanas. El primer subestadío de la profase I es el *leptoteno* (Fig.V.1, A), y se caracteriza por la gradual aparición de los cromosomas al microscopio de luz. La condensación continúa a través del leptoteno a manera de cuentas de rosario. Las regiones de esta estructura que se ensanchan reciben el nombre de cromómeros y se supone que representan las regiones de los cromosomas que han sufrido algún enrollamiento relacionado con sus segmentos no cromoméricos. Otra característica importante del cromosoma leptoténico es la presencia de un componente proteináceo lateral que corre a lo largo de cada

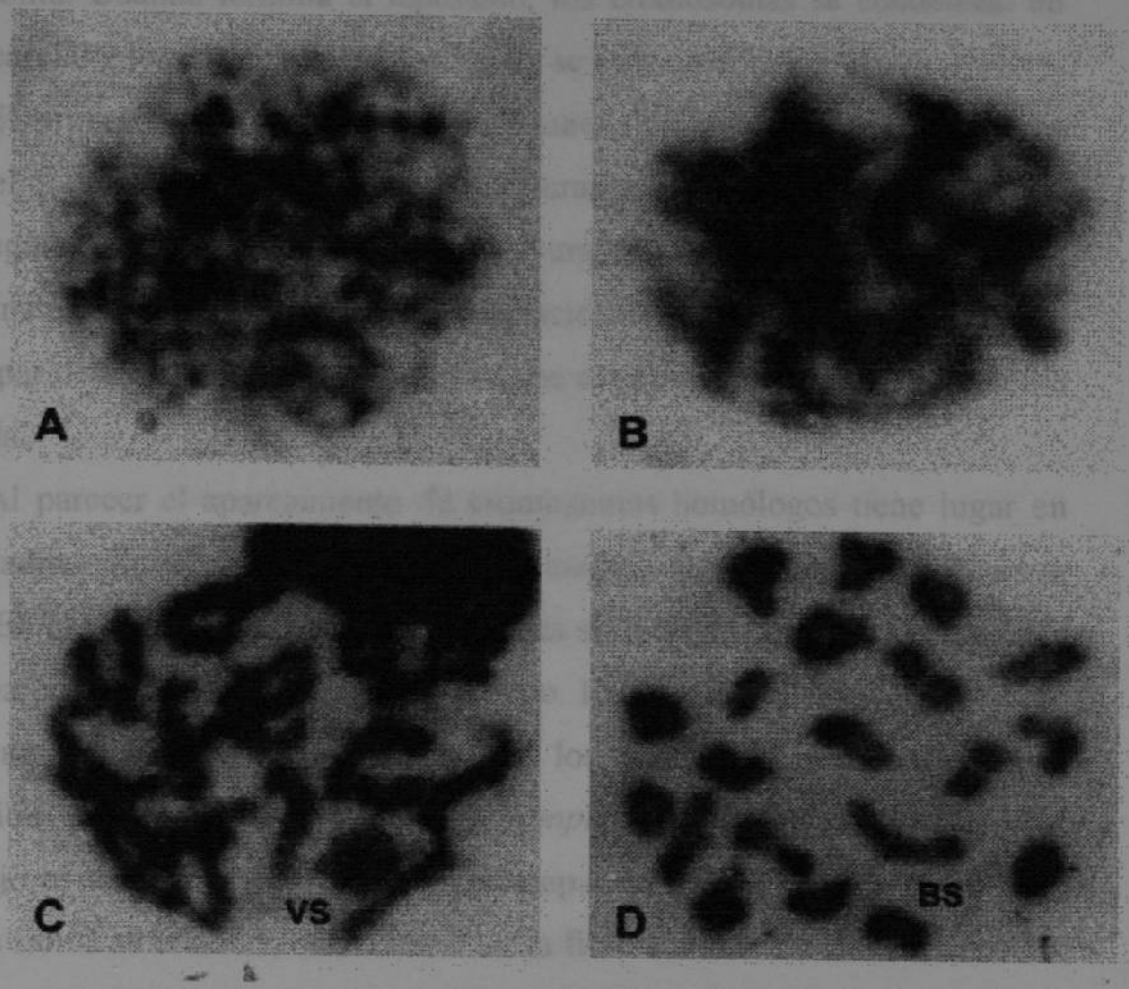

Figura V.1. Profase meiótica. Es la fase de mayor duración y por ello más fácil de encontrar de la meiosis. En el ratón se observan cuatro etapas principales: leptoteno (A), en esta etapa los cromosomas son evidentes como finas hebras de material cromatínico con una distribución al azar. Durante la etapa de cigoteno (B) las hebras de cromatina se aparean con sus homólogos, hacia el final de esta etapa los cromosomas X y Y, que no son homólogos se compactan en un cuerpo denso llamado vesícula sexual (VS). Es entonces cuando las células entran a la etapa más identificable de la profase, el paquiteno (C) donde la cromatina se vuelve menos condensada y separada. Durante la etapa final de la profase, llamada diacinesis (D), los cromosomas se acortan y condensan. Los quiasmas en su terminalización producen configuraciones circulares o cuadrirradiales. El bivalente sexual (BS) usualmente presenta una configuración característica de signo de exclamación.

cromosoma. Cuando termina el leptoteno, los cromosomas se condensan en forma parcial y los cromosomas homólogos se asocian con facilidad.

El proceso por medio del cual se unen los cromosomas homólogos recibe el nombre de *sinapsis* y tiene lugar durante el cigoteno (Fig.V.1, B) que es el segundo subestadío de la profase I. Durante la sinapsis los cromosomas se ordenan dentro de los confines del espacio nuclear. El complejo formado por un par de cromosomas homólogos recibe el nombre de complejo bivalente o tétrada.

Al parecer el apareamiento de cromosomas homólogos tiene lugar en dos estadíos. En el primero, los cromosomas quedan alineados de manera burda. En el segundo estadío, los cromosmas se aproximan mas estrechamente y en una precisa asociación punto por punto. Las micrografías electrónicas de los cromosomas en sinapsis indican que los procesos tienen lugar por la formación de una figura llamado el *complejo sinaptonémico* (CS). Este complejo es una estructura escalonada compuesta por tres barras paralelas y muchas fibras atravesadas que conectan a la fibra central con las dos laterales; las barras del CS simplemente participan en la estabilización de la condición de apareamiento.

El final de la sinapsis marca la terminación del cigoteno y el inicio del siguiente estadío de la profase I, el *paquiteno* (Fig.V.1, C). El paquiteno es el primero de los subestadíos de la profase que tiende a ser extraordinariamente largo. Durante este lapso, los homólogos se mantienen juntos estrechamente debido al complejo sinaptonémico.

El inicio del *diploteno*, el siguiente subestadío de la profase I de la meiosis, se reconoce por la disolución del CS y la tendencia de los cromosomas homólogos de los bivalentes (tétradas) a separarse de alguna manera, conforme se separan los cromosomas homólogos puede observarse

que permanecen unidos en puntos específicos que reciben el nombre de *quiasmas*. Los quiasmas generalmente se localizan dentro del cromosoma en sitios donde ha tenido lugar el intercambio genético durante el entrecruzamiento. Este sub-estadío suele ser incospícuo en el ratón y por lo tanto no se ilustra en la figura V.1.

El subestadío final de la profase I de la meiosis recibe el nombre de *diacinesis* (Fig.V.1, D), y prepara a los cromosomas para unirse con la fibras del huso meiótico. En muchos casos, los quiasmas desaparecen por deslizamiento a lo largo del cromosoma por un proceso que recibe el nombre de *terminalización*. La diacinesis termina con la desaparición de los nucleólos, la degradación de la envoltura nuclear y la movilización de las tétradas hacia la placa de metafase.

La *Metafase I* encuentra a cada par de cromosomas homólogos orientados de tal manera que ambas cromátidas de un cromosoma se encuentran dispuestas hacia el mismo polo.

Durante la anafase I, los cromosomas homólogos se separan. Puesto que no existe interacción entre una tétrada y la otra, los cromosomas materno y paterno de cada tétrada se segregan en dos células hijas (espermatocitos secundarios u ovocitos secundarios). La anafase I es el fenómeno citológico que corresponde a la distribución independiente en las leyes de Mendel.

La *Telofase I* de la meiosis produce cambios menos dramáticos que la telofase de la mitosis. Puesto que los cromosomas por lo general no se revierten a una condición de verdadera *interfase*. Aunque en muchos casos los cromosomas llegan a sufrir alguna dispersión, no alcanzan el estado de extensión extrema como sucede en el núcleo interfásico.

El estadío entre las dos divisiones meióticas recibe el nombre de *intercinesis* y generalmente es de corta duración. Estas células se caracterizan

por tener una cantidad diploide de DNA nuclear y un número haploide de cromosomas, puesto que a cada cromosoma todavía lo representa un par de cromátidas unidas.

La *Profase II* sigue a la intercinesis y es una profase mucho más simple que su predecesora. Los cromosomas se recondensan y se alinean en el plano ecuatorial y quedan unidos con juegos opuestos de fibras del huso. Las cromátidas entonces quedan separadas en la anafase II, como cada uno de los miembros de un par de cinetócoros hermanos, los cuales quedan separados uno del otro. Los productos de la meiosis normal son células haploides tanto en la cantidad de DNA nuclear como en el número de cromosomas.

De acuerdo a Loidl (1994), un aspecto sumamente importante de la meiosis es la recombinación genética, la cual produce progenie con nuevas combinaciones de características heredables que pueden ser probadas por selección natural. La recombinación en meiosis es un importante factor en la evolución. La fuente primaria de recombinación meiótica son organismos con un número haploide de cromosomas. La segunda fuente es el entrecruzamiento, el cual es la recombinación intracromosomal de tipo intergénico. Desde el punto de vista citológico, la función primaria del entrecruzamiento es proveer quiasmas como contactos estables entre cromosomas homólogos en orden para asegurar su segregación regular.

Consecuencias de las alteraciones en células espermatogénicas

Las mutaciones genéticas pueden ser transmitidas a la progenie a través de las células germinales lo cual se considera un riesgo serio (Leonard, 1973). Por otra parte, las mutaciones en las células germinales pueden causar desarrollo anormal del feto, resultando en aborto prematuro, muerte fetal, muerte al nacimiento o descendencia con desarrollo anormal. Más

preocupante aún es que las mutaciones germinales pueden afectar el desarrollo del individuo en una etapa posterior o en tejidos específicos, resultando en pubertad anormal, enfermedades neurológicas, muerte prematura o pueden dar origen a los llamados errores innatos del metabolismo. Por otro lado, una mutación en las células germinales puede ser letal a la siguiente generación debido a que las células diploides pueden contener una combinación no viable de cromosomas mutados, por ejemplo un cromosoma de una translocación puede haber perdido importante información y en cambio haber ganado información innecesaria (Freese, 1971).

Efectos de radiación electromagnética de alta frecuencia sobre células germinales.

El modelo de las células germinales reproductoras ha sido utilizado para evaluar el efecto genotóxico o citotóxico de radiaciones electromagnéticas de alta frecuencia de tipo ionizante, por ejemplo con rayos X, así encontramos que Kirk y Lyon (1984), estudiaron la inducción de malformaciones congénitas entre la progenie de ratones machos tratados con rayos X en etapas pre-meióticas y post-meióticas. Observaron un incremento en letalidad dominante y en la pérdida de embriones en la etapa de preimplantación. Además hubo una clara inducción de malformaciones congénitas en las etapas post-meióticas.

Por otro lado, Matsuda et al. (1989) observaron las aberraciones cromosómicas inducidas en la primera metafase de óvulos fertilizados con esperma recuperado de células espermiogénicas que fueron irradiadas con rayos X y tratadas con Mitomicina-C (MMC) en varios estadíos, usando técnicas de fertilización *in vitro* y cultivo de embriones. La frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas fue marcadamente alta en los óvulos

expuestos a rayos X de 4 grays de 16 a 20 días, no así en los expuestos de 0 - 8 días. Las aberraciones inducidas fueron predominantemente en la estructura de los cromosomas; brechas, rupturas y fragmentos o conformación en anillo.

También han sido estudiados los efectos de las microondas (otro tipo de radiación electromagnética de alta frecuencia, pero no ionizante) sobre las células espermatogénicas, específicamente en cromosomas meióticos de ratón, evaluado por la presencia de aberraciones cromosómicas, uno de estos trabajos fue realizado por Manikowska et al. (1978) con microondas pulsantes de 9.4 GHz, en él reportan perturbaciones en la meiosis consistentes en el aumento de translocaciones y univalentes en metafase. Resultados similares fueron observados con microondas de 2.45 GHz (Manikowska-Czerska et al., 1985), de acuerdo a estos autores sus hallazgos indican interferencia con el desarrollo normal de la espermatogénesis. Sin embargo, Beechey et al.(1986) realizaron una réplica de este estudio y aunque encontraron un efecto similar, aclaran que este fue menos severo que el reportado por Manikowska-Czerska et al. (1985), y atribuyen el efecto observado en su estudio, al aumento en la temperatura provocado por la exposición (efecto térmico) y no a la exposición en sí.

Efecto de los campos magnéticos, eléctricos y electromagnéticos en células germinales.

Se han encontrado pocos informes acerca del potencial genotóxico o citotóxico de los campos magnéticos, eléctricos y electromagnéticos en células germinales, de los trabajos existentes las metodologías empleadas suelen ser muy diversas. Las observaciones más indirectas provienen de estudios realizados sobre embriogénesis, ya que los parámetros analizados (porcentaje de implantación de embriones, letalidad fetal total, número y peso de los fetos

vivos, letalidad dominante, etc.) proveen información sobre la calidad genética de los espermatozoides (y por consiguiente de las células espermatogénicas en sí) involucrados en los procesos reproductivos. Kokoreva et al. (1990) encontraron que la exposición crónica a campos magnéticos constantes de 0.4 T durante el proceso espermatogénico en ratas, provocaba un incremento pequeño pero significativo en la letalidad de fetos preimplantados, lo cual puede indicar una mayor frecuencia de mutaciones letales en los gametos. Observaron además que los espermatozoides maduros son resistentes a una exposición aguda al campo magnético y que esta exposición no causa mutaciones en los gametos.

Por otro lado Kowalzuk y Saunders (1990) determinaron los efectos de los campos eléctricos sobre embriogénesis empleando la prueba de letales dominantes, para esto expusieron ratones machos continuamente durante dos semanas a un campo eléctrico vertical de 50 Hz a 20 kV/m. Las densidades de corriente inducidas se estimaron en cerca de 100 mA/m^2. No se encontraron diferencias significativas en función de la exposición, en cuanto a los porcentajes de fertilización y sobrevivencia de embriones después de la implantación. Por su parte Benz et al. (1987) emplearon también esta prueba para determinar el posible efecto de la exposición a los campos magnéticos y eléctricos producidos por las líneas de alto voltaje (60 Hz, 10 gauss – 50 kv/m y 3 gauss – 15 kv/m) sobre las células germinales, sus resultados no muestran efectos significativos sobre parámetros como número de mutaciones letales dominantes, embriones viables y muertes prematuras.

Se han empleado análisis morfológicos del epitelio seminífero para detectar el posible efecto de los campos electromagnéticos sobre tejido; Galaktionova et al. (1985), examinaron citológicamente el epitelio espermatogénico de ratones expuestos durante 30 días a campos magnéticos

constantes de 1.6 T y observaron la destrucción de elementos celulares maduros, debido a lo cual la cantidad total de células espermatogénicas fue significativamente menor durante e inmediatamente después de la exposición. Asimismo, Ivanova y Kartashev (1991) observaron la supresión de la espermatogénesis en ratón bajo la influencia crónica de un campo eléctrico alternante (40 kV/m, 50 Hz), como resultado de alteraciones en espermatogonias y espermátides. Otros estudios realizados por Lokhmatova y Pastukhova (1993) y por Lokhmatova (1993) han reportado un efecto degenerativo sobre el epitelio espermatogénico a consecuencia de la exposición de ratones a campos eléctricos de 17 KHz (100 kV/m), algunas de las observaciones incluyeron la descamación de las capas del epitelio germinativo, reducción del número de células productoras de testosterona y cambios microcirculatorios, ambos estudios sugieren un posible efecto acelerador de envejecimiento reproductivo.

Para determinar los efectos celulares de los campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja en la espermatogénesis del ratón se ha empleado también citometría de flujo del DNA, técnica que permite analizar la distribución del contenido de DNA en los diferentes tipos celulares involucrados en la espermatogénesis. De Vita et al. (1995) expusieron ratones macho híbridos a un campo de 50 Hz, con una intensidad de 1.7 mT. En los grupos de 4 horas de exposición se halló un descenso estadísticamente significativo en las espermátides elongadas después de 28 días del tratamiento. Este cambio sugiere un posible efecto citotóxico y/o citostático. También Furuya et al. (1998) emplearon este método, esta vez con campos magnéticos de 50 Hz y 1.0 mT durante diferentes períodos de tiempo, y encontraron evidencia de un posible efecto en la diferenciación y proliferación de las espermatogonias, al encontrar variaciones en la distribución de los distintos

tipos celulares involucrados en la espermatogénesis (espermatogonias, espermatocitos primarios y espermátides) y en la concentración de testosterona sérica.

Otros estudios se han enfocado a esclarecer los posibles efectos adversos de la exposición a campos magnéticos provenientes de dispositivos de diagnóstico, como la Resonancia Magnética (RM), Withers et al. (1985) analizaron el efecto citotóxico de un campo magnético de 0.3 T, originado por un dispositivo de imagen de RM, sobre diferentes clases de células espermatogénicas de ratón. Sus resultados no mostraron efectos adversos a consecuencias del empleo de estos dispositivos de diagnóstico. En contraste, otro estudio realizado por Narra et al. (1996), muestra que la exposición a un campo magnético de 1.5 T generado por RM parece causar algunos efectos deletéreos sobre espermatogénesis y embriogénesis en el ratón, ya que se encontró una disminución en conteo espermático y un efecto importante en el desarrollo y preimplantación de embriones.

También ha sido analizada la posible relación entre la exposición a campos magnéticos, debida a actividades laborales y subfertilidad masculina, definida ésta por parámetros como morfología, motilidad y concentración espermática (Lundsberg et al., 1995). Los resultados obtenidos no encuentran asociación entre la exposición a campos magnéticos menores de 0.3 μT y efectos deletéreos sobre la salud reproductiva masculina.

Tateno et al. (1998), evaluaron el efecto clastogénico de los CEM (50 Hz; 20 mT) sobre cromosomas espermáticos humanos; no observaron diferencias significativas en la incidencia de espermatozoides con anormalidades cromosómicas entre el grupo expuesto y el grupo control. Los tipos de aberraciones observadas y sus incidencias fueron similares en ambos grupos.

Por otra parte, Stankevich et al. (1981) expusieron ratones blancos 6 horas diarias durante 2 meses a campos eléctricos estáticos de 15-70 kV/m y observaron incrementos significativos en translocaciones y otras anormalidades en cromosomas meióticos.

Viñals-Bellido, (1990) estudió los efectos de los campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia sobre las células de la línea seminal de la rata albina y encontró alteraciones morfológicas a nivel de los túbulos seminíferos y variaciones en los niveles de hormonas en la sangre, al comparar las ratas tratadas con las no tratadas, además observó una disminución en el número de espermatogonias del tipo A, de espermatocitos leptoténicos y de espermatocitos paquiténicos.

Como parte de un estudio muy amplio encaminado a esclarecer los posibles efectos de imanes comerciales con aplicaciones terapéuticas (*Terapión*, Valencia, España), Tablado (1996) examinó la posible influencia de los campos magnéticos estáticos producidos por dicho imán (0.7 T), en el desarrollo del testículo y el epidimio y sobre la formación de los espermatozoides en el ratón; encontró que al parecer los campos magnéticos generados por el imán Terapión-Plus no alteran los procesos mencionados.

En otro estudio relacionado al anterior, se verificaron parámetros cinemáticos de espermatozoides de ratón (motilidad y patrones de desplazamiento). Aunque fueron observados cambios en motilidad y el patrón de desplazamiento en los grupos tratados con campos magnéticos, los procesos de iniciación de la motilidad espermática y de los patrones de desplazamiento no fueron afectados por el tratamiento magnético (0.7 T), además la producción espermática no presentó cambios (Tablado et al., 1996).

Más recientemente este mismo grupo de investigadores (Tablado et al., 1998), realizaron un estudio sobre los posibles efectos de este imán comercial

(Terapión-Plus) sobre las características morfológicas y morfométricas de los espermatozoides de ratón. De acuerdo a sus resultados, estos parámetros no fueron afectados por la exposición a campos magnéticos estáticos (0.7 T), aunque mencionan un posible efecto en el proceso espermatogénico.

En la literatura revisada hasta el momento, no se encontró un estudio similar a este; en donde se considerarán los aspectos cromosómicos y morfológicos en conjunto en células espermáticas de ratones expuestos *in vivo* a campos electromagnéticos oscilantes de 60 Hz.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y 2.0 mT de intensidad, son capaces de inducir cambios citogenéticos a nivel cromosómico y morfológico en células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* línea genética CD1 *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citogenético de los campos electromagnéticos de 60 Hz en la estructura cromosómica y morfología de células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* línea genética CD1 *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Determinar el efecto citogenético *in vivo* de una exposición aguda (72 hrs) a campos electromagnéticos de 60 Hz y 2.0 mT de intensidad sobre células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* línea CD1.

B) Estimar el potencial sinérgico *in vivo* de una exposición a campos electromagnéticos de 60 Hz y 2.0 mT de intensidad en combinación con la aplicación de Mitomicina-C (5 mg/kg) sobre los cambios citogenéticos en células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* línea CD1.

C) Determinar el efecto citogenético *in vivo* de una exposición fraccionada (10 días/8 h diarias) a campos electromagnéticos de 60 Hz y 2.0 mT de intensidad sobre células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* línea CD1.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLOGICO

En el presente estudio se utilizaron 24 ratones macho *Mus musculus* línea genética CD1, de 3 meses de edad, con un peso aproximado de 25-35 g, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina U.AN.L. Durante el periodo previo a la exposición los animales fueron mantenidos en jaulas plásticas y se les administró alimento Purina Inc. Co. y agua *ad libitum*. Al término de la exposición los animales fueron sacrificados inmediatamente por dislocación cervical.

EXPOSICIÓN AL CAMPO MAGNETICO

Los animales fueron tratados con campos electromagnéticos de 60 Hz y de 2.0 mT de intensidad, dentro de un solenoide como el que previamente se especificó en el capítulo I de este documento y que corresponde al modelo de exposición *in vivo*, tal y como ahí se describe.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron tres experimentos independientes, con tres animales para cada uno de los tratamientos y los testigos.

1) Exposición aguda (72 horas continuas) a un campo electromagnético de 2.0 mT.
2) Exposición aguda (72 horas continuas) a un campo electromagnético de 2.0 mT, combinada con la aplicación del agente químico mutagénico Mitomicina-C, a dosis de 5 mg/kg.

Estos dos experimentos se realizaron con tres grupos experimentales: un grupo tratado (expuesto), un testigo negativo que no fue expuesto a agentes químicos ni físicos, y un testigo positivo al cual le fue aplicado Mitomicina-C (5mg/kg), intraperitonealmente.

3) Exposición fraccionada a un campo electromagnético de 2.0 mT., durante 10 días, 8 horas diarias (de 8:00 a 16:00 horas). Dos grupos experimentales: un grupo tratado (expuesto) y un grupo testigo negativo (no expuesto a ningún agente físico ni químico). En este caso no se usó testigo positivo debido a que no fue posible establecer la intoxicación crónica de los animales con el mutágeno químico Mitomicina-C.

CITOGENÉTICA DE CELULAS ESPERMATOGENICAS

Obtención del material de estudio

Para obtener las muestras de estudio (testículos y epidídimo) se hizo necesario el sacrificio de los animales, que se llevó a cabo mediante dislocación cervical. Una vez hecho esto, con ayuda de un bisturí se practicó una incisión ventral en dirección longitudinal y se extrajeron los testículos y el epidídimo que acompaña a cada uno.

Procesamiento del material

Para las especificaciones de reactivos y equipo empleados en el procesamiento del material de estudio ver el Apéndice V.A de este capítulo.

El método seguido para la obtención de cromosomas meióticos de ratón es el descrito por Evans et al. (1964), con algunas modificaciones, en resumen, se procedió de la siguiente manera:

1. Se removieron los testículos y se colocaron en solución isotónica de citrato de sodio (2.2%) a temperatura ambiente. Se rasgó la túnica albugínea y se agitaron los testículos en la solución para remover la grasa adherida.
2. Se transfirieron los testículos a una caja Petri que contenía solución de Citrato de sodio 2.2% fresca y suavemente se retiraron los tubulos seminíferos. Con ayuda de unas pinzas finas y de un bisturí se retiró el contenido de los túbulos hasta obtener una suspensión. Se transfirió el *fluido sobrenadante a un tubo de centrifuga de 10 ml.*
3. Se centrifugó la suspensión celular obtenida a 500 r.p.m. durante 5 minutos. Esto generalmente deja la mayor parte de espermatozoides en suspensión y sedimenta las células más grandes, incluyendo los espermatocitos. Se descartó el fluido sobrenadante y se suspendieron las células sedimentadas en aproximadamente 4 ml de solución hipotónica de citrato de sodio 0.7 %.
4. Se dejaron las células en solución hipotónica por 20 minutos en baño maría (37°C) al término de este tiempo se centrifugó a 500 r.p.m. por otros 5 minutos.
5. Se removió tanto sobrenadante como fue posible. Enseguida se resuspendieron las células en el resto con ayuda de una pipeta Pasteur. Se añadieron rápidamente 0.25 ml de fijador, directamente en las células suspendidas. Se añadió más fijador por las paredes del tubo, gota a gota, colocando el tubo cónico en un vortex para mantenerlo en movimiento y permitir así que las suspensión se mezcle con el fijador, hasta completar 4 ml. Después de 5 minutos en reposo, se sedimentaron las células de nuevo por centrifugación y se resuspendieron en fijador fresco. Se repitió el cambio de fijador después de 10 minutos.

6. Para la preparación de las laminillas, se tomó un poco de la suspensión con una pipeta Pasteur. Se goteó sobre un portaobjetos desengrasado a temperatura ambiente, hasta cubrir la mayor parte del portaobjetos. Es importante gotear desde una altura de aproximadamente 1.2 mts para así obtener figuras más dispersas que permiten una mejor observación. Se gotearon 10 laminillas por ratón (5 con material del testículo derecho y 5 del izquierdo).
7. La tinción de las laminillas preparadas se llevó a cabo con Giemsa.

ANÁLISIS CITOGENETICO

Las laminillas de cromosomas meióticos se emplearon para la observación de aberraciones cromosómicas en espermatocitos. Para la morfología y número cromosómicos se empleo microscopía de luz (Zeiss) primeramente con objetivo 10X para localizar la fase a analizar (diacinesis), una vez localizadas cada imagen se observó en objetivo 100X para revisar el número de bivalentes y su morfología, se analizaron 60 figuras en diacinesis por grupo experimental y los resultados se expresaron como porcentaje de anormalidades cromosómicas. En la Figura V.2 se muestran las principales figuras de cromosomas meióticos consideradas en este estudio.

MORFOLOGÍA ESPERMATICA

La técnica empleada para la obtención de espermatozoides de ratón fue adaptada de la previamente descrita por Wyrobek (1979) y consistió de lo siguiente:

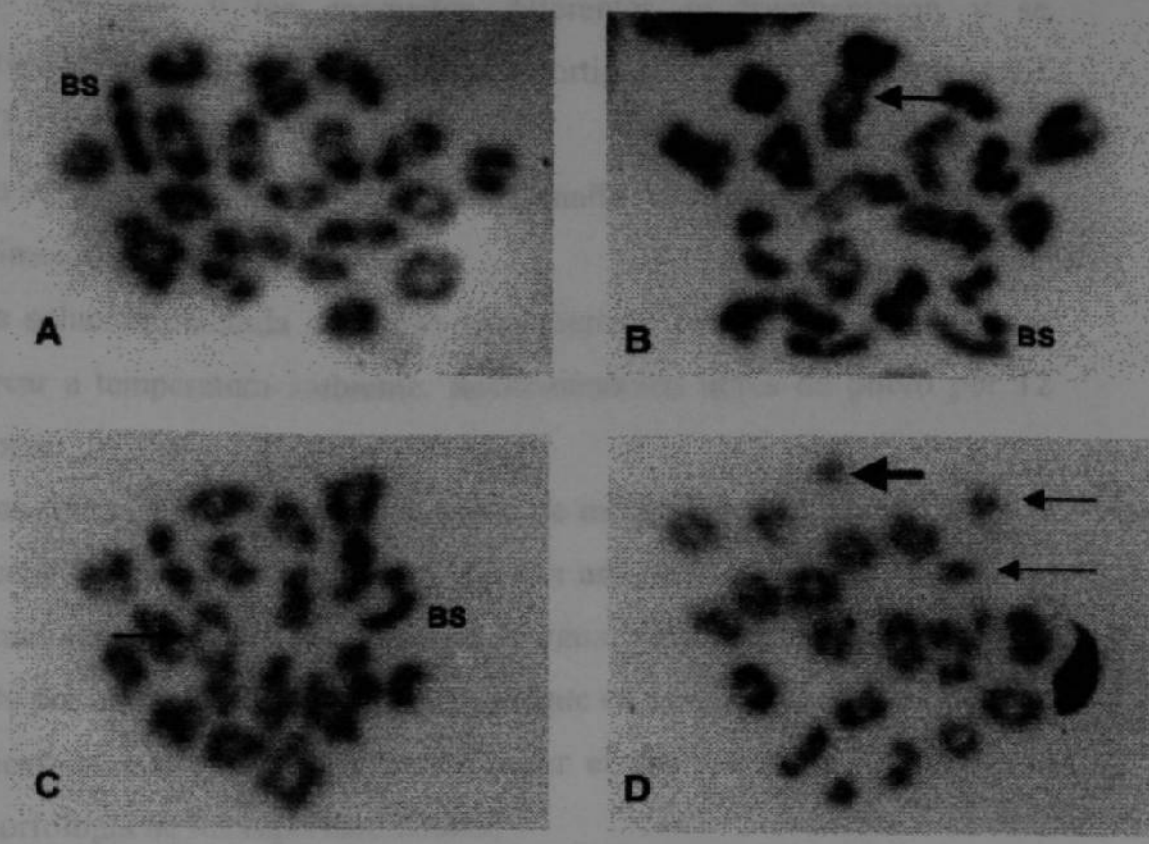

Figura V.2. Análisis citogenético en espermatocitos primarios en etapa de diacinesis. A) cromosomas en diacinesis con una conformación normal de 19 bivalentes autosómicos y un bivalente sexual (BS) con el X y Y en una configuración que recuerda a un signo de exclamación. B-C) señaladas con una flecha, figuras con alteraciones del tipo translocación. Las translocaciones recíprocas involucran el intercambio de segmentos terminales entre cromosomas no homólogos y requieren dos rupturas y uniones. D) diacinesis que presenta un fragmento (flecha gruesa) y univalentes autosómicos (flechas delgadas), los fragmentos son aberraciones que suelen ser eliminadas durante el proceso mitótico, sin embargo algunos pequeños fragmentos acéntricos pueden encontrarse en espermatocitos en división. Los univalentes autosómicos resultan de asinapsis (ausencia de apareamiento entre segmentos homólogos) o de desinapsis (separación debido a fallas en la formación de quiasmas).

1. El epidídimo y los conductos deferentes se fragmentaron y se suspendieron en 1.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.3
2. La solución obtenida se filtró en una malla de cobre de 200 mesh para eliminar los fragmentos de tejido.
3. La solución obtenida se utilizó para preparar los frotis que se dejaron secar a temperatura ambiente, manteniéndolos libres de polvo por 12 horas.
4. Los frotis se fijaron en una solución de metanol, formaldehído, y ácido acético en las mismas proporciones, por una hora.
5. Finalmente estos frotis se lavaron en agua y se tiñeron con Eosina Y al 1% por una hora. Se lavaron nuevamente en agua corriente y se dejaron secar durante 24 horas antes de hacer el análisis microscópico de la morfología de los espermatozoides.

Se revisaron 10 frotis de cada animal contando 100 células por preparación (3000 células por grupo experimental) con microscopía de luz (Zeiss) en objetivo 100X para determinar el porcentaje de espermatozoides alterados, contabilizando además las diversas anomalías observadas. Entre estas se consideraron formas bioflageladas, espermas bicefálicos, filamentosos, con cabeza amorfa y aquellos con gancho deforme, tal y como se ilustra en la figura V.3. Los resultados fueron expresados como porcentaje de anormalidades espermáticas.

ANÁLISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos de cada uno de los experimentos fueron procesados usando el paquete estadístico SPSS versión 8.0, de acuerdo a Ferrán-Aranaz (1996).

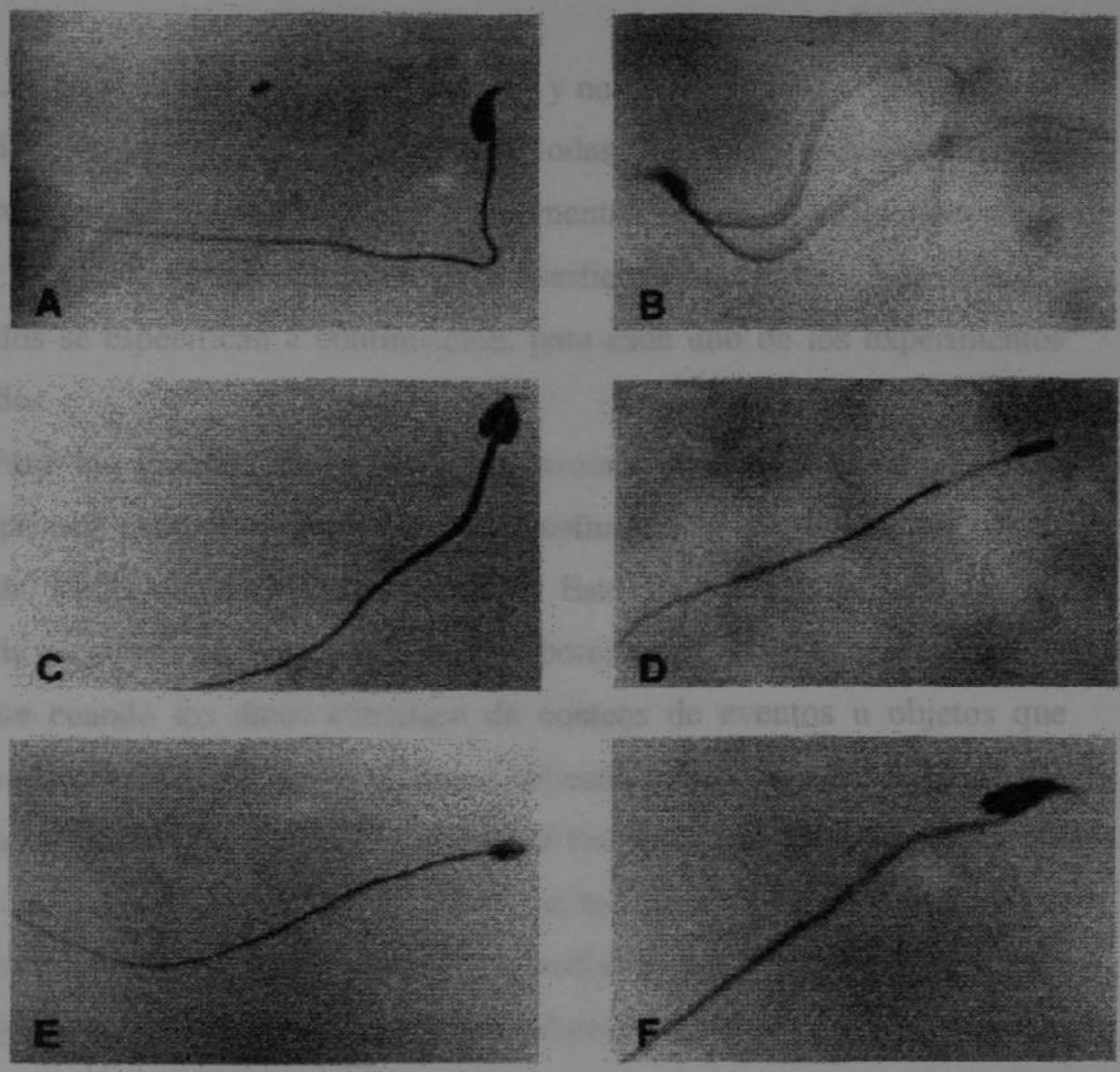

Figura V.3. Anomalías morfológicas del espermatozoide que fueron consideradas en este estudio, en células germinales de ratón *Mus musculus* Línea CD-1. A) espermatozoide normal, en el ratón la cabeza del espermatozoide tiene forma de garfio; B) espermatozoide biflagelado; C) espermatozoide bicéfalo; D) espermatozoide filamentoso; E) espermatozoide amorfo; F) espermatozoide con gancho deforme (100 x).

Las pruebas realizadas (paramétricas y no paramétricas) dependieron de la distribución de los datos, por lo cual en todas las fases de experimentación, así como en cada uno de los grupos experimentales se aplicó primeramente la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar normalidad. Los análisis realizados se especifican a continuación, para cada uno de los experimentos realizados.

Para las pruebas de aberraciones cromosómicas en espermatocitos, como primer paso, fue necesario la transformación de los datos a raíz cuadrada (Square Root Transformation). Este tipo de transformación es aplicable cuando las varianzas son proporcionales a las medias. Esto es frecuente cuando los datos consisten de conteos de eventos u objetos que ocurren al azar (Zar, 1999). La ecuación aplicada fue: $X' = x + 3/8$. Esta es la fórmula recomendable en los casos en que los datos son muy pequeños y/o algunas de las observaciones son ceros, como sucedió en este estudio. En todos los casos donde fue necesaria una transformación de datos, la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov fue aplicada a los datos transformados.

Exposición aguda (72 hrs) y combinada a un Campo Electromagnético de 2.0 mT + 5.0 mg / kg de Mitomicina-C (Experimentos 1 y 2).

Para la prueba de aberraciones cromosómicas en espermatocitos, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis para comparar entre sí los tres grupos experimentales (Tratamiento, testigo negativo, testigo positivo), en el caso de los grupos que tuvieran diferencia significativa, fue necesario además aplicar el análisis no paramétrico U de Mann Whitney por parejas, para determinar cual de los grupos marcaba la diferencia.

Para la prueba de morfología de espermatozoides se empleó Análisis de varianza con prueba de Tukey a los grupos con distribución normal, y Kruskall Wallis con U de Mann Whitney a los de distribución no normal.

Exposición fraccionada 10 días / 8 horas diarias a un campo electromagnético de 2.0 mT (Experimento 3).

La comparación de los grupos experimentales empleados en cada una de las pruebas realizadas en esta fase fue la siguiente: se realizó la prueba de U de Mann Whitney para el porcentaje de aberraciones cromosómicas cuyos datos presentaban una distribución de tipo no normal; y una prueba t de Student, con prueba F para el porcentaje de espermatozoides con anomalías en la cabeza, ya que los datos presentaban distribución normal.

RESULTADOS

Exposición aguda (72 horas) a un CEM de 60 Hz y 2.0 mT (Experimento # 1).

Los resultados del análisis citogenético se presentan en la Tabla V.1. El análisis estadístico de este experimento, no mostró diferencias significativas entre el grupo tratamiento y el testigo negativo en lo que corresponde a la prueba de aberraciones cromosómicas, pero si se encontró, como era de esperarse, una diferencia significativa entre el grupo tratamiento y el testigo positivo (Mitomicina-C), ya que este grupo presentó un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en espermatocitos.

Por otra parte la prueba de anomalías en la cabeza del espermatozoide mostró un aumento en el porcentaje del grupo tratamiento al compararse con el testigo negativo, el cual no obstante, no fue significativo, sin embargo se encontró diferencia estadística en el grupo testigo positivo como cabría esperar, ya que presentó un porcentaje de espermatozoides con anomalías en la forma de la cabeza atribuidos al efecto citotóxico de la Mitomicina-C.

Exposición a un CEM de 60 Hz, 2.0 mT combinado con MMC (5 mg/kg). (Experimento # 2).

Los resultados de este experimento mostraron una diferencia significativa entre los grupos para la prueba de porcentaje de aberraciones cromosómicas y anormalidades en la morfología espermática de acuerdo a la prueba Kruskall Wallis, sin embargo, el análisis con la U de Mann Whitney indicó que la diferencia fue entre los grupos tratamiento y testigo negativo contra el testigo positivo, ya que este ultimo presentó un mayor porcentaje de

Grupo Experimental	Media Aritmética % ACM (± DS)	Media Aritmética % AME (± DS)
2.0 mT / 72 h	1.02 (0.070)	3.93 (2.33)
Testigo no expuesto	0.61 (0.01)	2.60 (1.57)
Control positivo con MMC	1.63 (0.17)*	6.00 (3.14)*
2.0 mT / 72 h + 5.0 $mg.Kg^{-1}$ de MMC	0.79 (0.32)	2.40 (1.54)
Testigo no expuesto	0.98 (0.32)	3.10 (1.97)
Control positivo con MMC	1.59 (0.16)*	5.10 (1.77)*
2.0 mT / 10 días / 8 h diarias	1.60 (0.16)	2.17 (1.42)
Testigo no expuesto	1.51 (0.79)	1.70 (1.29)

Tabla V.1 Porcentaje de aberraciones cromosómicas en espermatocitos meióticos (ACM) y anormalidades en la morfología del esperma (AME) en células germinales de ratones expuestos a campos magnéticos oscilantes de 60 Hz. Se realizaron tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno. Las diferencias estadísticas son marcadas como * ($p < 0.05$).

aberraciones como cabía esperar debido al efecto mutagénico de la Mitomicina-C (Ver Tabla V.1), de esto se interpreta que el campo magnético no causó efectos en estos parámetros. Un hallazgo importante en este experimento fue que se observó un efecto antagónico entre la Mitomicina-C y el campo magnético aplicado ya que los animales sometidos a ambos tratamientos simultáneamente mostraron porcentajes de aberraciones cromosómicas y anormalidades espermáticas menores que los del grupo testigo positivo que fue tratado con el mutágeno solamente.

Exposición Fraccionada (10 días / 8 h diarias) a un CEM de 60 Hz y 2.0 mT (Experimento # 3).

Los resultados de este experimento no mostraron relación estadística entre la exposición a un CEM y un aumento en la ocurrencia de aberraciones cromosómicas en espermatocitos primarios. Tampoco se observó ninguna diferencia en el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas de acuerdo al análisis con la prueba paramétrica de t de Student con prueba F. Los porcentajes correspondientes obtenidos para el grupo tratado y el testigo se presentan asimismo en la tabla V.1.

DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se asume que no fue posible demostrar un efecto genotóxico o citotóxico inducido por CEM de 60 Hz en células germinales de ratones expuestos a una intensidad de 2.0 mT, tanto en forma aguda (72 horas), combinada con el mutágeno químico Mitomicina-C, y fraccionada (10 días, 8 horas diarias).

No es fácil contrastar estos resultados con otras investigaciones ya que el modelo de las células germinales ha sido empleado en pocas ocasiones para evaluar la genotoxicidad de los CEM de 60 Hz, y las metodologías empleadas han sido muy diversas entre sí, lo que dificulta la comparación de un trabajo a otro. Algunos de los trabajos más próximos en metodología a esta investigación fueron realizados con microondas (también una radiación electromagnética pero de mayor frecuencia). Así Manikowska et al. (1978) trabajaron con células meióticas para la detección de aberraciones cromosómicas, hallando un aumento en la frecuencia de éstas, estos resultados fueron confirmados por el estudio de Manikowska-Czerska et al. (1985). Sin embargo, al trabajar con microondas el efecto térmico provocado por la exposición es un factor que disminuye la fidelidad de las observaciones hechas y se sugiere que el efecto no es debido a la exposición al campo en sí sino a las condiciones provocadas por la exposición, como ponen en relieve Beechey et al. (1986), ya que en su estudio encontraron evidencia de que el aumento en la temperatura asociado con la exposición a microondas puede provocar un incremento en la aparición de aberraciones, debido á esto los resultados de estos trabajos son cuestionables. Una ventaja experimental de utilizar radiaciones de frecuencia extremadamente baja (60 Hz) como el campo magnético utilizado en este estudio, es que el incremento en la

temperatura atribuído a la exposición, es prácticamente despreciable (Lin, 1994).

En el presente estudio se encontró que la exposición aguda a un CEM de 60 Hz, con una intensidad de 2.0 mT, no afectó la frecuencia de aberraciones en espermatocitos ni la frecuencia de anomalías morfológicas en espermatozoides de ratón. Estos resultados coinciden con las observaciones de Withers et al. (1985). Sin embargo, Narra et al. (1996) mencionan en su trabajo un ligero efecto supresor de la espermatogénesis a consecuencia de una exposición a un campo magnético estático.

Por otro lado, los resultados aquí presentados aportan evidencia de que los CEM pudieran tener un efecto antagónico al de la Mitomicina-C, ya que se observó una disminución en la aparición de aberraciones cromosómicas y de anomalías en espermatozoides en el grupo tratado con ambos agentes simultáneamente, en comparación con el grupo testigo positivo tratado únicamente con la Mitomicina-C. Estos resultados se ven apoyados por observaciones similares obtenidas en otros trabajos de esta línea de investigación, ya que también se encontró un efecto antagónico de los CEM sobre la proliferación celular en linfocitos humanos tratados con Mitomicina-C (Heredia-Rojas et al., 2001) así como por los resultados mostrados en el capítulo anterior de este documento en donde se observó este mismo efecto antagónico entre el campo magnético y la Mitomicina-C en lo que respecta a la producción de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea de ratón. Asimismo, Okonogi et al. (1996) han observado que un campo magnético es capaz de influir sobre el efecto de la Mitomicina-C en la síntesis de DNA y de esta manera provocar el antagonismo entre ambos tratamientos, sin embargo el mecanismo preciso requiere investigación adicional.

En contraste, otros investigadores como Scarfi et al. (1991) no encontraron ningún cambio cuando evaluaron el efecto clastogénico de la Mitomicina-C en linfocitos humanos expuestos a CEM pulsantes de frecuencia extremadamente baja.

Por otro lado, con respecto al experimento # 3 que correspondió a la exposición fraccionada de 10 días consecutivos y 8 horas diarias, tampoco se observaron efectos significativos en las variables analizadas. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Kowalczuk y Saunders (1990), Benz et al. (1987), Tablado et al. (1996 y 1998), Lundsberg (1995), Tateno et al. (1998), Galaktionova et al. (1985). Aunque existen trabajos que han encontrado efectos supresores de la espermatogénesis y degenerativos en células germinales por exposición crónica a campos magnéticos y eléctricos: Kokoreva et al. (1990), Ivanova y Kartashev (1991); Lokhmatova y Pastukhova (1993) y Lokhmatova (1993).

En los casos de las exposiciones aguda y crónica es importante señalar que en aquellos trabajos donde se observaron efectos significativos sobre células germinales (Narra et al., 1996; Kokoreva et al., 1990, Ivanova y Kartashev, 1991; Lokhmatova y Pastukhova, 1993 y Lokhmatova,1993) fueron empleadas intensidades de CEM o de campo eléctrico mayores a la empleada en este estudio y además el tipo de campo utilizado fue diferente, ya que algunos de estos trabajos incluyeron estudios con campos magnéticos estáticos.

Por otra parte, el análisis cualitativo de las aberraciones y anomalías morfológicas observadas en este estudio (resultados no mostrados) tampoco apoya la idea de un efecto nocivo o dañino sobre las células germinales, ya que los tipos de anomalías observadas en los animales tratados son similares a los de los animales testigo negativo. Asimismo, se sabe que en animales no

tratados pueden aparecer en forma espontánea diversas anomalías estructurales en cromosomas (Leonard, 1973) y la proporción en que aparecen suele variar entre diversas líneas genéticas e incluso puede haber variabilidad entre un mismo grupo de animales. En el presente estudio los porcentajes de aberraciones cromosómicas en espermatocitos de animales expuestos al campo magnético y los del testigo negativo fueron bajos y comparables con los de otros investigadores (Manikowska-Czerska et al., 1985). Tampoco se observaron anomalías en la cabeza de los espermatozoides fuera de los tipos reportados por autores como Wyrobek (1979) y Tablado (1996).

CONCLUSIONES

1. Una exposición aguda de 72 h *in vivo* a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia a la intensidad de 2.0 mT no tiene efecto genotóxico o citotóxico sobre las células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* Línea CD-1.
2. Los campos electromagnéticos de 60 Hz a una intensidad de 2.0 mT y una duración de exposición de 72 h tienen un efecto antagónico al de la Mitomicina-C en el porcentaje de aberraciones cromosómicas en espermatocitos primarios y anormalidades de la morfología espermatica de ratones *Mus musculus* Línea CD-1 expuestos *in vivo*.
3. La exposición fraccionada (10 días / 8 h diarias) *in vivo* a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia a la intensidad de 2.0 mT no tiene efecto genotóxico o citotóxico sobre las células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* Línea CD-1.

LITERATURA CITADA

Adler I.D. (1982). Mouse spermatogonia and spermatocyte sensitivity to chemical mutagens. Cytogenet. Cell Genet. 33:1-2, 95-100.

Beechey C.V., Brooker D., Kowalczuk C.I., Saunders R.D., Searle A.G. (1986). Cytogenetic effects of microwave irradiation on male germ cells of the mouse. Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med. 50: 909-918.

Benz R.D., Carsten A.R., Baum J.W., Kuehner A.V. (1987). Mutagenicity and toxicity of 60 Hz magnetic and electric fields. Contractors final report. New York State Power Lines. Project. New York, U.S.A.

Chehval M.J., Mehan D.J., Volk L.R. (1977). Meiotic figures in the testicular biopsy of subfertile man. Fertility and Sterility 29:3.

De Vita R., Caballo D., Raganella L., Eleuteri P., Grollino M.G. and Calugi A. (1995). Effects of 50 Hz Magnetic fields on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometric analysis. Bioelectromagnetics 16:330-334.

Evans E.P., Brecken G. and Ford C.E. (1964). An air-drying method for meiotic preparations fron mammaliam testes. Cytogenetics 3: 289-294.

Ferrán-Aranaz M. (1996). SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico. Primera edición. Editorial McGraw Hill/Interamericana de España S.A. Pag.560.

Freese E. (1971). Molecular mechanisms of mutations. Consequences of genetic alterations in higher organisms. Alexander Hollaender (Ed.). Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection. Volume 1. Plenum Press New York-London.

Furuya H., Aikawa H., Hagino T., Yoshida T. and Sakabe K. (1998). Flow cytometric analysis of the effects of 50 Hz magnetic fields on mouse spermatogenesis. Nippon Eiseigaku Zasshi 53: 420-425.

Galaktionova G.V., Mastriukova V.M., Strzhizhovskii A.D. (1985). Sensitivity of mammalian tissues to prolonged exposure to high-tension permanent magnetic fields. Kosm. Biol. Aviakosm. Med. 19: 78-81.

Heredia-Rojas J.A., Rodríguez-De la Fuente A.O., Velazco-Campos M.R., Leal-Garza C., Rodríguez-Flores L.E., De la Fuente-Cortez B. (2001). Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human Lymphocytes *in vitro*. Sister chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate. Bioelectromagnetics 22: 145-149.

Hugenholtz A.P., Bruce W.R. (1983). Radiation induction of mutations affecting sperm morphology in mice. Mutat. Res. 107: 177-185.

Ivanova L.A., Kartashev A.G. (1991). The effect of alternating electric field of industrial frequency on testicles of white mice. Fiziol Zh 37: 71-78.

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

Karp G. (1987). Biología Celular. Proliferación celular y división. Editorial McGraw-Hill de México. pp. 744-753.

Kirk K.M. and Lyon M.F. (1984). Induction of congenital malformations in the offspring of male mice treated with X–rays at pre-meiotic and post-meiotic stages. Mutat. Res. 125: 75-85.

Kokoreva L.V., Chuvpilo T.A., Postynnikova A.M. (1990). Effect of a constant high-density magnetic field on reproductive functions in male rats. Kosm. Biol. Aviakosm. Med. 24: 28-30.

Kowalczuk C.I. and Saunders R.D. (1990). Dominant lethal studies in male mice after exposure to 50-Hz electric field. Bioelectromagnetics 11:129-137.

Leonard A. (1973). Observations on meiotic chromosomes of the male mouse as a test of the potential mutagenicity of chemicals in mammals. A. Hollander (Ed.) Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection. Volume 3. Plenum Press. New York-London. U.S.A.

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

Lokhmatova S.A. (1993). An ultrastructural analysis of the testes in mice subjected to long-term exposure to a 17 kHz electrical field. Radiobiologia 33: 342-346.

Lokhmatova S.A. and Pustukhova Iu.R. (1993). Morphologic and histoenzymologic analysis of effect of electrical fields at 17 kHz on testis and testis appendages in mice. Aviakosm. Ekolog. Med. 27: 50-54.

Loidl J. (1994). Cytological aspects of meiotic recombination. Experientia 50:285-294 Birkhäuser Verlag, CH 4010 Basel/Switzerland.

Lundsberg L.S., Bracken M.B. and Belanger K. (1995). Ocupationally related magnetic field exposure and male subfertility. Fertility and Sterility 63: 384-391.

Lyon M.F. (1981). Sensitivity of various germ-cell stages to environmental mutagens. Mutat. Res. 87:323-345.

Manikowska E., Luciani J.M., Servantie B., Gerski P., Obrenovitch J. and Stahl A. (1978). Effects of 9.4 GHz microwave exposure on meiosis in mice. Experientia 35: 3-5.

Manikowska-Czerska E., Czerski P., Leach W.M. (1985). Effects of 2.45 GHz microwaves on meiotic chromosomes of male CBA/CAY mice. J Hered. 76: 71-73.

Matsuda Y., Seki N., Utsugi T., Takeuchi and Tobari I. (1989). X-Ray and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-Ray and MMC damage. Mutat. Res. 211:65-75.

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

Murphy J.C., Kaden D.A., Warren J. and Sivak A. (1993). Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology. International Commision for protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutat. Res. 296: 221-240.

Narra V.R., Howell R.W., Goddu S.M. and Rao D.V. (1996). Effects of a 1.5 –Tesla static magnetic field on spermatogenesis and embryiogenesis in mice. Invest. Radiol. 31: 586-590.

Okonogi I., Nakagawa M., Tsugi Y. (1996). The effects of a 4.7 Tesla Static Magnetic Field on the frequency of micronucleated cells induced by Mitomycin. Tohoky T. Exp Med. 180: 209-215.

Salazar A.M. y Herrera-Montalvo L.A. (1992). Daño Genético inducido por agentes físicos y químicos. Rev Fac Med UNAM 35: 75-82.

Scarfi M.R., Bersani F., Cossarizza A., Monti D., Castellani G., Cadossi R., Franceschetti G., Franceschi C. (1991). Spontaneous and Mitomycin C induced micronuclei in human lymphocytes exposed to extremely low frequency pulsed magnetic fields. Biochem. and Biophys. Res. Commun. 176: 194-200.

Stankevich K.I., Badaeva L.N., Samosh L.V. and Shumoua L.Z. (1981). Cytogenetic and gonadotoxic effect of static electric field. (English translation). Gig. Sanit. 9-11.

Tablado L. (1996). Efectos de los campos magnéticos estáticos sobre el desarrollo del testículo y el epididimo y sobre la formación de los espermatozoides en el ratón. Tesis Doctoral. Facultad de Biología de la Universidad de Valencia. Valencia, España.

Tablado L., Perez-Sanchez F. and Soler C. (1996). Is sperm motility maturation affected by static magnetic fields? Environ. Health. Perspect. 104: 1212-1216.

Tablado L., Perez-Sanchez F., Nuñez J. (1998). Effects of exposure to static magnetic fields on the morphology of mouse epididymal sperm. Bioelectromagnetics, 19:377-383.

Tateno H., Iijima S., Nakanishi Y., Kamiguchi Y., Asaka A. (1998). No induction of chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to low frequency electromagnetic fields. Mutat. Res. 414: 31-35.

Viñals-Bellido P. (1990). Aportaciones al estudio experimental de la influencia de los campos magnéticos pulsantes sobre las células espermatogénicas de la rata albina. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de Valencia. Valencia, España.

Withers H.R., Mason K.A. and Davis C.A. (1985). MR effect on murine spermatogenesis. Radiology, 156: 741-741.

Wyrobek A.J., Heddle J.A., Bruce W.R. (1975). Chromosomal abnormalities and the morphology of mouse sperm heads. Can. J. Genet. Cytol. 17: 675-681.

Wyrobeck A.J. (1979). Changes in mammalian sperm morphology after X-ray and chemical exposures. Genetics 92:1 Pt 1 Suppls. 105-119.

Wyrobek A.J., Gordon L.A., Burkhart J.G., Francis M.W., Kapp R.W. Jr., Malling H.V., Topham J.C., Whorton M.D. (1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res. 115:1 1-72.

Zar J.H. (1999). Biostatistical analysis. Chapter 13 Data Transformations. Fourth edition. Editorial Prentice Hall, U.S.A. pp.

APENDICE V.A

REACTIVOS

* Eosin Y Fisher Certified Biological Stain 25 g. (0.88 oz.) Lote No. 701532 Fisher Scientific Company Chemical Manufacturing Company Fair Lawn, New Jersey.
* Colorante de Giemsa (polvo) Standard Técnica química S.A. México.
* Aceite de Inmersión Tipo B 100 ml. Lote No. 950927 Analytica de México S.A. de C.V.
* Colchicine Lote No. 108F0564 Signal Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.
* Glicerina $CH_20HCHOHHCH_20H$ P.M. 92.10 1000 ml. Lote No. 3"2136 Reactivo Analítico NORMA ACS Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V.
* Acido Acético Glacial CH_3COOH P.M. 60.05 Lote No. 02AA9607 1000 ml. Reactivo Analítico NORMA ACS Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V.
* Cloroformo $CHCl_3$ P.M. 119.39 Lote No. 39758 Seg. Especif. A.C.S. 900 ml. J.T. Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, México.
* Eter Etílico Anhidro $(C_2H_5)20$ P.M. 74.12 Lote No. 21TF9240 Reactivo Analítico NORMA ACS Control Técnico y Representaciones.
* Fosfato de Sodio Monobasico $NaH_2PO_4 \cdot H_20$ P.M. 137.99 Lote No. 001037 Productos Químicos Monterrey S.A.

* Fosfato de Potasio Monobasico KH_2PO_4 P.M. 136.09 Lote NO. 970725-5 Analytica de México, S.A. de C.V.
* Líquido especial para limpieza de material clínico y de laboratorio Texatron Neutro Lote No. 970728 Analytica de México S.A. de C.V.
* Formaldehído 37% HCHO P.M. 30.03 Lote No. 001075 Productos Químicos Monterrey S.A.
* Cloruro de Sodio (Cristales) NaCl P.M. 58.44 Lote No. 001075 Productos Químicos Monterrey, S.A.
* Solución CS Fórmula: Cloruro de Sodio 0.9 g Agua Inyectable 100 ml Laboratorios Pisa S.A. de C.V.
* Mytomicin-C (Cristalline) From Streptomyces caespitosus Lote No. 41F-0239 2 mg vial Sigma Chemical Company.

EQUIPO

* Parafilm "M" Laboratory Film American National Can TM Greenwich, C.T. 06836
* Portaobjetos 25 X 75 mm x 1.2 mm ERIE Scientific Company Made in U.S.A.
* Surgical Gloves Sensi Touch Ansell-Medical Ansell Incorporated Alabama.
* Disposable Pasteur Pipettes Flint Glass Length 9" Chase Instruments Corp. Cat. No. 93
* Algodón Absorbente PROTEC Derivados de Gasa S.A. de C.V.
* Gasa Absorbente Tejido 20 x 12 Derivados de Gasa S.A. de C.V.
* Tubo Cónico Graduado 15 ml. No. 8080 Pyrex

* SIP Vortex Mixer Baxter Scientific Products Cat. 58223-1
* Laboratory Stirrer/Hotplate Corning Model PC-320
* General Laboratory Centrifuge Type GLC-1 Bio-Medical Equipment Sorvall Newtown, Connecticut U.S.A.
* Jeringas Estériles de Plastico, 3 ml. Plastipak B-D Con aguja 21 x 33 mm Becton Dickinson and Co.

CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados encontrados, del presente estudio se puede concluir lo siguiente:

1.- Se diseñaron, construyeron y caracterizaron dos sistemas de exposición de material biológico, *in vitro* e *in vivo*, a campos electromagnéticos oscilantes de 60 Hz que satisfacieron las características de confiabilidad requeridas.

2.- Una exposición a campos magnéticos de 60 Hz a intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 mT es capaz de incrementar la proliferación celular de linfocitos humanos *in vitro*.

3.- Los parámetros hemáticos de ratones expuestos *in vivo*, fueron modificados por campos magnéticos de 60 Hz y de 1.0, 1.5 y 2.0 mT, en lo que concierne a una disminución de los linfocitos y un aumento en los neutrófilos.

4.- Los campos magnéticos de 60 Hz a dosis de 1.5 y 2.0 mT produjeron efectos clastogénicos en eritrocitos de médula ósea de ratones expuestos *in vivo*.

5.- La exposición a campos magnéticos de 60 Hz y de 1.0, 1.5, y 2.0 mT de intensidad magnetica, no produjo alteraciones en aberraciones cromosómicas de espermatocitos primarios y morfología espermática de ratones expuestos *in vivo*.

6.- Se observó un efecto antagónico entre campos magnéticos oscilantes de 60 Hz y el mutágeno químico Mitomicina-C en lo que respecta a proliferación celular de linfocitos *in vitro*, inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón *in vivo*, aberraciones cromosómicas en espermatocitos de ratón y anormalidades morfológicas del espermatozoide *in vivo*.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

Jacobi-Elizondo J.S., Heredia-Rojas J.A., Rodríguez-Padilla C., Tamez-Guerra R.S., Gomez-Flores R. (2000). Los campos electromagnéticos y el sistema inmune. Ciencia-UANL. Vol III No.2: 166-175.

Heredia-Rojas J.A., Rodriguez-De la Fuente A.O., Velazco-Campos M.R., Leal-Garza C.H., Rodríguez-Flores L.E. and De la Fuente-Cortez B. (2001). Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes *in vivo*: Sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate. Bioelectromagnetics 22: 145-149.

Jacobi-Elizondo J.S., Gomez-Flores R., Tamez-Guerra R.S., Rodríguez-Padilla C., and Heredia-Rojas J.A. (2001). Acute effects of 60-Hz electromagnetic fields on *ex vivo* murine Lymphocyte and macrophage functions and in vitro tumor cell growth. Rev. Lat. de Microbiol. y Parasitol. Vol. 43 No.3 pp ---

Heredia-Rojas J.A., Caballero-Hernandez D.E., Rodriguez-De la Fuente A.O., Ramos-Alfano G. And Rodríguez-Flores L.E. (2001). Lack of alterations on meiotic chromosomes and morphological characteristics of male germ cells in mice exposed to a 60 Hz and 2.0 mT magnetic field. Bioelectromagnetics (in revision).

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO