

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO Y
CITOTOXICO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS
DE 60 Hz SOBRE ERITROCITOS DE MEDULA OSEA
DE RATON *Mus musculus* LINEA BALB / C *in vivo*.

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA

GERARDO RAMOS ALFANO

MONTERREY, N. L.

MAYO DEL 2000

TL

QH545

.E42

R3

c.1



1080094979

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO Y CITOTOXICO
DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS DE 60Hz SOBRE
ERITROCITOS DE MEDULA OSEA DE RATON *Mus musculus*
LINEA BALB/C *in vivo*.

ASESOR TESIS TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE BIOLOGO

MC JOSE ANTONIO MEDIA ROJAS
DIRECTOR INTERNO
PRESENTA

GERARDO RAMOS ALFANO

MC LAURA E. RODRIGUEZ FLORES
DIRECTOR EXTERNO

MONTERREY, NL

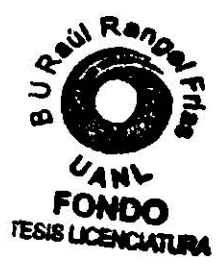
MONTERREY, NL

MAYO DEL 2000

MAYO DEL 2000



04545
E42
R3
c-1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO Y CITOTOXICO
DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS DE 60Hz SOBRE
ERITROCITOS DE MEDULA OSEA DE RATON *Mus musculus*
LINEA BALB/C *in vivo*.

ASESORES DE TESIS



MC JOSÉ ANTONIO HEREDIA ROJAS
DIRECTOR INTERNO



MC LAURA E. RODRIGUEZ FLORES
DIRECTOR EXTERNO

MONTERREY, NL

MAYO DEL 2000

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACION DEL POTENCIAL GENOTOXICO Y CITOTOXICO DE
LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS DE 60Hz SOBRE
ERITROCITOS DE MEDULA OSEA DE RATON *Mus musculus* LINEA
BALB/C *in vivo*.

COMISION DE TESIS


MC JOSE ANTONIO HEREDIA ROJAS
PRESIDENTE


MES MARTHA ALICIA SANTOYO STEPHANO
SECRETARIO


IQ MA. ESPERANZA CASTAÑEDA GARZA
VOCAL


LIC MARCO ANTONIO GONZALEZ VEGA
SUPLENTE

LOCALIZACION Y FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Física perteneciente al Departamento de Ciencias Exactas y de Apoyo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL
PAICYT Clave CN031-98

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Héctor Arnoldo Ramos Gutierrez y Aida Alfano Guerra por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, con esto entrego el fruto de lo que un día cosecharon.

A mis hermanos:

Héctor Arnoldo por enseñarme a ser perseverante y fuerte ante cualquier reto,

Aida Itzamara por darme el ejemplo de respeto y responsabilidad en la vida,

Mayela del Jesús por ser un ejemplo de dedicación y empeño en el trabajo,

Claudia A. Sánchez Peña y

Marco A. Medrano Zavala por aceptar ser parte de ésta familia.

A Héctor Alejandro y Marco Tadeo por la sonrisa que siempre tienen para mí.

Quisiera agradecer al Sr. Director de la Facultad de Ciencias Biológicas MC Juan Manuel Adame Rodríguez por el apoyo y la amistad que me brindó durante mi licenciatura.

Al MC José Antonio Heredia Rojas por aceptarme en su grupo de trabajo e involucrarme en el fascinante mundo de la investigación.

De la misma forma a los maestros del Departamento de Ciencias Exactas y de Apoyo: IQ Esperanza Castañeda Garza, MES Martha Alicia Santoyo Stephano, Lic Margarita González Gutierrez, Lic. Marco Antonio González Vega, QI Samuél Eduardo Castillo, Arq. Isaias Balderas Candanosa y Consuelo Garza Valero.

A mis maestros de licenciatura por darnos las armas para llegar a ser profesionistas en Ciencias Biológicas acordes a las necesidades de nuestra sociedad. En especial al Biol. Alejandro Ledezma Menxueiro, Biol. Manuel Torres y Biol. Lourdes Bajas padrinos de la generación.

A mis compañeros de laboratorio Diana Elia Caballero Hernández, Nancy Torres Ríos, Abraham Ocatvio Rodríguez de la Fuente, Andrés Mendiola Jiménez, Sandra Iracheta, Laura y Jessica Jacobi.

A todas las personas que me brindaron su amistad durante este tiempo: Herminio Fuentes Vélez, Nancy Torres Ríos, Diana Elia Canballero Hernández, Armando Elizondo Quiroga, Balam Araujo Velázquez, Helena Sánchez Tual, Fernando Arcivar González, Liliana Salinas Flores, Karla Segura García, Adriana Escalera Arredondo, Perla Ybarra, Zindy Maldonado, Mayra Mayela Ríos, Armando Jiménez Camacho, Carlos Ramos Arguelles, Leonora Peña Hernández, Gabriela Damas Buenrostro, Marco Contreras, Susy Lozano, Susana Díaz

Turrubiates, Darwin Elizondo, Elizabeth Suasnavar, Gabriel Ruíz, Katy Muzquíz, y a todas las personas que trascendieron de alguna u otra forma durante *mí* carrera.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	
Generalidades de Campos Electromagnéticos	5
Efecto de los CEM sobre seres vivos	8
Efecto genotóxico y citotóxico de los CEM	10
Micronúcleos y campos electromagnéticos	13
HIPOTESIS	19
OBJETIVO	
General	20
Específicos	20
MATERIAL Y METODO	
Reactivos	22
Equipo de estimulación magnética	22
Cristalería	23
Material y equipo quirúrgico	23
Equipo de laboratorio	23
Modelo físico de estimulación magnética	24
Diseño Experimental	25
Tratamiento del testigo positivo	26
Obtención y procesamiento de médula ósea	26
Tinción de muestras	27
Lectura de laminillas	27
Definición de variables	28
Análisis estadístico	28
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	37
LITERATUA CITADA	38
APENDICES	
Apéndice I	48
Apéndice II	49

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el efecto de los campos electromagnéticos (CEM) oscilantes de 60Hz y 1.0, 1.5 y 2.0miliTesla (mT) de densidad de flujo magnético en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/C utilizando la prueba de micronúcleos (MN). Se realizó una exposición continua de 72h para cada dosis magnética y una de 2.0mT combinada con el mutágeno químico Mitomicina-c (MMC) que es un buen inductor de MN. Además se hizo una exposición fraccionada de 10 días con 8h diarias de exposición magnética replicada a los 6 y 12 meses para ser un total de tres. En cada experimento se utilizó un testigo negativo sin exposición a ningún factor químico o físico y un testigo positivo con MMC (5mg/kg), solamente en la exposición fraccionada no se usó un testigo positivo. Posterior a la exposición magnética de cada tratamiento, se realizó la prueba de MN para evaluar el efecto genotóxico por lo cual se contabilizó la aparición de estos cuerpos en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC), por otra parte, se evaluó el %EPC como indicador de citotoxicidad, éstos se observaron en un microscopio compuesto al objetivo de inmersión. Se realizó el análisis estadístico de los resultados y no se encontró un aumento en la frecuencia de MN ni cambios en la proliferación celular a 1.0mT de intensidad magnética a las 72h en comparación con el testigo negativo. En los tratamientos de 1.5 y 2.0mT de intensidad magnética se observó un aumento en la frecuencia de MN en comparación con el testigo negativo ($p < 0.05$) a las 72h, sin embargo, no se observó cambios en el %EPC. Para el experimento de 2.0mT más MMC mostró una disminución de la frecuencia de MN en comparación con el grupo tratado solo con la MMC, lo cual denota un efecto antagónico entre el CEM y el mutágeno químico. Por otra parte, no se observó ningún cambio en el %EPC en esta condición. En los

experimentos fraccionados de 2.0mT en todas sus replicaciones mostraron un aumento en la frecuencia de MN ($p < 0.05$) y no se observó ningún cambio en el %EPC. De estos resultados se concluye que: ocurre un efecto genotóxico de los campos electromagnéticos oscilantes de 60Hz a la intensidad de 1.5 y 2.0mT. Así como un efecto antagónico entre el CEM de 2.0mT con la MMC. Además no se observó ningún efecto citotóxico de los CEM en eritrocitos de médula ósea al evaluar el %EPC.

INTRODUCCION

Actualmente las actividades industriales han dependido en gran medida de la energía eléctrica. La forma de distribuir esta energía es por medio de subestaciones de distribución, las cuales en su origen no estaban cercanas al hombre, pero éste en su expansión, se ha acercado a estas áreas de potencial peligro.

Los campos electromagnéticos son conocidos como la interacción de un campo magnético y un campo eléctrico variables ambos en el tiempo, dentro del espectro electromagnético forman parte de las radiaciones no ionizantes ya que su energía no es la suficiente para lograr el desplazamiento de electrones de los átomos con los cuales interactúa.

Durante los últimos 20 años se ha tratado de evaluar el efecto que producen los campos electromagnéticos en los seres vivos, tales como el flujo de iones calcio en la membrana celular, incidencia de leucemia en niños, carcinogénesis y genotoxicidad entre otros, sin poder lograr un consenso general entre los investigadores del área.

El efecto genotóxico de los campos electromagnéticos podría estar dado por una acción clastogénica de éstos, lo cual se puede evaluar mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea por ser ésta una prueba rápida, sencilla y económica que permite además evaluar la citotoxicidad

mediante el porcentaje de eritrocitos policromáticos como un indicador de la proliferación celular.

El presente estudio tiene por objeto evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los campos electromagnéticos oscilantes de 60Hz en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/C *in vivo* a intensidades magnéticas mayores a las empleadas en forma doméstica pero equivalentes a aquellas que pueden utilizarse a nivel industrial o en subestaciones eléctricas.

ANTECEDENTES

Generalidades de Campos Electromagnéticos

El hombre, desde tiempos de Tales de Mileto (640-546 a.d.n.e.) hablaba de las atracciones magnéticas, asimismo los chinos emplearon desde hace más de 2000 años la brújula magnética para la navegación y viajes en los desiertos de Mongolia. Como sabemos el fundamento es adoptar una orientación, la cual es ejercida por un campo magnético circundante (Wood, 1991).

En el año de 1820, el Físico danés Hans Christian Oersted observó que una corriente eléctrica puede cambiar la orientación de la aguja de una brújula en forma semejante a como lo hacía un imán. Esta observación lo condujo a pensar que en la vecindad de un conductor por el cual fluye una corriente de electrones existe un campo que se manifiesta como un imán, de esta manera vinculó la electricidad con el magnetismo (Galar-Castelan, 1988).

Se reconoce como campo magnético a la región en el espacio en la cual un objeto magnetizado puede magnetizar a su vez a otros cuerpos, algunas clasificaciones de estos campos los separan en homogéneos y heterogéneos de acuerdo a la distribución de su intensidad y en estáticos u oscilantes de acuerdo a si son constantes o variables en el tiempo. En un campo magnético homogéneo la intensidad del campo es uniforme, mientras que en un campo heterogéneo la intensidad disminuye de forma proporcional con la distancia del centro. Por otra parte, en un campo magnético estático las líneas de fuerza del campo así como su dirección son constantes en el tiempo mientras que en un campo oscilante se alterna la carga en cada pulso a la vez que la intensidad de

éstos también es variable. El efecto de los campos magnéticos sobre los distintos sistemas biológicos va a depender de si éste es homogéneo, heterogéneo, estático u oscilante (Pothakamury y cols, 1993).

Por otro lado, el origen de un campo eléctrico se debe a que las cargas eléctricas son estáticas. Cuando los campos magnético y eléctrico varían con el tiempo en una determinada región, ambos se relacionan estrechamente de tal forma que todo campo eléctrico que varía con el tiempo va siempre acompañado de un campo magnético también variable y, a la inversa, si se presenta este último, va a ir siempre acompañado de otro campo eléctrico variable. Parker (1993) resume esta interrelación entre los campos eléctricos y magnéticos como una sola entidad física estableciendo con esto el campo electromagnético (CEM) como se muestra en la figura 1.

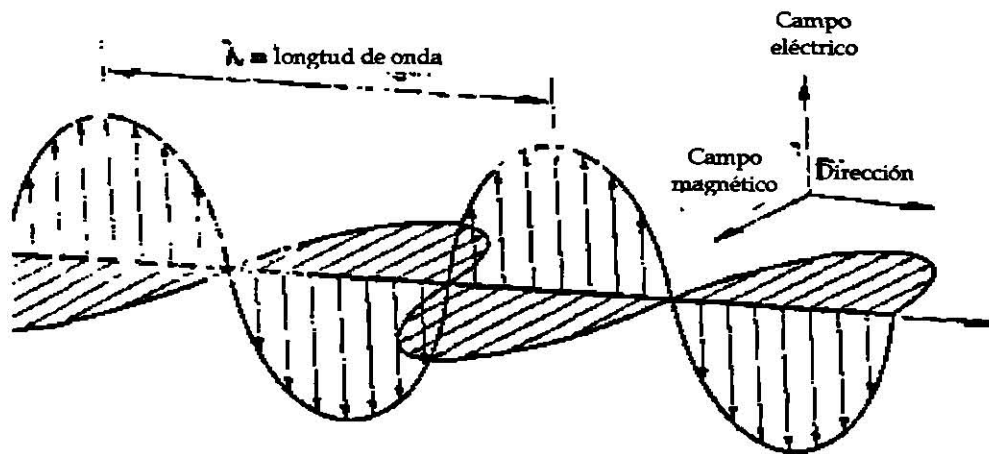


Figura 1.- Esquema donde se muestra la interacción de un campo eléctrico y un campo magnético como una sola entidad física: el CEM

El término frecuencia al hablar de CEM se refiere a el número de ciclos completos de variación sinusoidal por unidad de tiempo. En el caso de un

campo eléctrico y magnético tienen una frecuencia fundamental a la de los voltajes de transmisión y corrientes. En general, para la transmisión de corriente alterna (AC) la frecuencia es de 60 Hertz (Hz¹) en Norteamérica y de 50 Hz en Europa y otras partes del mundo (Stewart, 1979).

La fuerza de un campo magnético está dada por una cantidad llamada densidad de flujo magnético, la cual es el número de líneas de fuerza que cruzan una unidad de área. También llamada intensidad magnética, la densidad de flujo magnético tiene por unidad en el sistema sexagesimal el oersted (Oe) que se estableció por acuerdo internacional en 1932 para sustituir el gauss (G), a pesar de esto, aún se utiliza más en la literatura éste último. La diferencia entre ellos, es que el Oe es de intensidad tal, que al actuar sobre un polo magnético unitario le imprime una fuerza de un dina en la misma dirección. Para el Sistema Internacional de unidades la densidad de flujo magnético es dada en Teslas (T), existe una cantidad de 10 000 gauss en cada Tesla (US Congress, 1989).

La magnitud del campo eléctrico está en proporción directa al voltaje y decrece a medida que aumenta la distancia. En forma similar, el campo magnético depende de una variable eléctrica y de la distancia. Su magnitud está relacionada directamente con el flujo de corriente (medido en amperes) y es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia (Morales-Matamoros, 1997).

¹ Hz= Es la unidad para medir la frecuencia en el SI de Unidades y es igual a un ciclo por segundo.

Efectos de los CEM sobre Seres Vivos

Existen evidencias de un efecto de los CEM de frecuencia extremadamente baja sobre el flujo del ión calcio a través de la membrana celular tales como un aumento en la absorción celular o una disminución en su liberación al medio extracelular (Blackman y cols, 1988; Walleczec y Budinger, 1992; Liburdy, 1992), cabe mencionar la importancia en múltiples procesos fisiológicos que tiene este mecanismo de flujo intermembranal como transmisor de señales del exterior al interior de la célula. Esto se relaciona con aquél estudio de Mishima (1988) en ratas hembras no osteoporósicas expuestas a CEM pulsantes por seis meses en el que encontró un incremento en el volumen y la actividad en la formación de hueso en las patas traseras.

Por otro lado, desde finales de los años setenta se comenzó a presentar evidencia epidemiológica que indicaba que la exposición a campos electromagnéticos generados por líneas de abastecimiento eléctrico podrían incrementar la frecuencia de varios tipos de cáncer, particularmente leucemia, tumores cerebrales y cáncer de mama (Schreiber y cols, 1993; Wertheimer y Leeper, 1979). Asimismo informan Fajardo-Gutierrez y cols (1993) quienes en un estudio llevado a cabo en niños con leucemia que vivían en zonas cercanas en donde se producían CEM se encontró que las fuentes generadoras de campos electromagnéticos tuvieron efecto sobre los niños, siendo más afectados los que vivían cerca de cables de alto voltaje.

Por otro lado, Thomson y cols (1988) realizaron un implante de células leucémicas en hembras de ratones, y posteriormente las expusieron a un campo magnético de 60Hz, de 1.4 μ T a 500 μ T por 3h diarias antes del implante,

posterior a este de 6h diarias, cinco días por semana de un total de ocho semanas sin encontrar al final de este tiempo en los ratones sobrevivientes un efecto en la incidencia o progresión de la leucemia.

Otro modelo importante para evaluar los efectos de los CEM ha sido sobre la síntesis y secreción de la hormona melatonina por la glándula pineal bajo exposición a éstos para tratar de observar algún mecanismo inductor o promotor del cáncer, ya que se ha observado que al aumentar los niveles de esta hormona se reduce el nivel de los estrógenos, de esta forma se reduce el riesgo de desarrollar cáncer de mama, sin embargo, al estar bajo la influencia de un CEM se observa una disminución en el nivel y secreción de la hormona pineal (Kato y cols, 1993; 1994).

Sin embargo y pese a lo dicho anteriormente, aún se considera que no existen pruebas convincentes en la literatura publicada para apoyar la opinión de que la exposición a campos eléctricos y magnéticos de frecuencia extremadamente baja generados por fuentes como aparatos electrodomésticos, pantallas de visualización y líneas eléctricas locales, sea peligroso para la salud (Davis y cols, 1992).

De la misma manera, a pesar de los diversos estudios de los efectos de los CEM en los organismos, Macklis (1993) menciona que no existe un consenso general actual acerca de si estos cambios, son fisiológicamente significativos.

Efecto Genotóxico y Citotóxico de los CEM

• Algunas investigaciones realizadas acerca del efecto de campos eléctricos y magnéticos sobre la estructura del ADN (Acido desoxiribonucleico) en células humanas de la línea K562 y en células de ovario de hamsters chinos (CHO), revelan no haber detectado efectos medibles al aplicar campos de baja intensidad (Reese y cols, 1988; Fiorani y cols, 1992). Sin embargo, Mitnik y cols (1995) mencionan cambios a nivel fisicoquímico en la conformación de la molécula de ADN al ser sometida a la acción de un campo eléctrico.

• Al estudiar el efecto sobre la actividad mitótica de un campo magnético de baja frecuencia en médula ósea de ratón, en un rango de 3 a 127kOe aplicado por una hora Strzhizhovski y cols (1979) encontraron que en el rango de 3 a 8kOe era estimulada la división, sin embargo, de 54 a 127kOe ésta actividad se veía inhibida. En este mismo trabajo se menciona que no se incrementó de manera significativa en ninguna de las intensidades magnéticas probadas las aberraciones cromosómicas.

En una investigación realizada por Prasad y cols (1984) con ratones machos de la Línea BALB/C, éstos fueron expuestos por una hora a un campo magnético estático de 7.05kG originado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y se compararon con otro grupo sin exposición, para evaluar aberraciones cromosómicas en médula ósea. El grupo expuesto fue sacrificado a las 2h, 24h y 48h posterior al tratamiento y el control sin exposición al campo magnético se sacrificó a las 24h. Se encontró que todos los grupos expuestos presentaron una razón de 0,02 aberraciones aparentes por célula, estas aparentes aberraciones fueron en la forma de cromosomas metacéntricos

resultado de la unión de los centrómeros de cromosomas o posiblemente de una simple asociación de cromosomas. Sin embargo, éstos investigadores concluyeron que los resultados no advierten acerca de efectos citogenéticos en médula ósea a la exposición de RMN.

Por otra parte, Zwingelberg y cols (1993), expusieron ratas a CEM de 50Hz y 30mT de intensidad con el fin de evaluar la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas así como también la proliferación celular en linfocitos periféricos sin encontrar cambios significativos en ambos parámetros.

Otro estudio realizado por Gorczynska (1987) informó que los campos magnéticos estáticos de 0.05 y 0.3T aplicados en cerdos de Guinea durante una hora diaria por 7 meses inducen una disminución de eritroblastos así como un incremento en el porcentaje de células del tejido hematopoyético excepto en megacariocitos cuyo porcentaje se ve disminuido, y en el sistema linfático de estos se observó un incremento de células plasmáticas.

• Para evaluar el efecto de los CEM en los cromosomas de células amnióticas humanas, Nordenson y cols (1994) expusieron estas células a un campo magnético sinusoidal de 50Hz y 30 μ T por 72h, los resultados mostraron que la exposición permanente al tiempo e intensidad magnética empleada no incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

De la misma manera, Livingston y cols (1991) no encontraron un efecto por la exposición de linfocitos humanos y células CHO *in vitro* a CEM al evaluar la tasa de crecimiento y la capacidad reproductiva normal de ambos tipos de células.

• Lorimore y cols (1990) realizaron estudios en ratones susceptibles a la inducción de leucemia mieloide aguda después de ser expuestos a radiación ionizante, éstos fueron expuestos durante un período de 19 días a CEM de 50Hz y 20mT, y no encontraron un efecto significativo que revelara una asociación entre los CEM y la leucemia mieloide aguda.

En un estudio hecho por Cadossi y cols en 1991 con el objeto de investigar el efecto al combinar la ciclofosfamida y CEM pulsantes en ratones inyectados con dosis sencillas de 200 mg/kg, y después se irradiaron durante 24h/día durante 1, 4, 6, 8, y 10 días. Se observó que el día 1° y 2° se disminuían los glóbulos blancos de sangre periférica en el grupo expuesto al campo, también se evaluó el efecto sobre el peso del bazo, encontrándose que los ratones expuestos al CEM durante 24h después de la inyección de ciclofosfamida eran afectados los días 6 y 8. De esta manera se observó un incremento del efecto al combinar ciclofosfamida y el CEM pulsante comparado con el grupo expuesto solo al químico.

Por otra parte, Khalil y Qassem (1991) expusieron cultivos de linfocitos humanos a pulsos electromagnéticos de 50Hz y 1.05mT de intensidad por diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 72h). Observaron que un tiempo de exposición de 24 y 48h no causó una diferencia en el índice de proliferación celular ó un incremento en la frecuencia de cambios en cromátides hermanas, sin embargo a las 72h se observó una disminución en la actividad mitótica, asimismo una incidencia alta de aberraciones cromosómicas.

Micronúcleos y Campos Electromagnéticos

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 excluidos 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 ribonucleico, 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 éstos como la alteración principal en médula ósea de hámsters tratados con un agente mutagénico (Boller y 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 y cols (1999).

Una de las primeras investigaciones que trata de evaluar genotoxicidad producto de un efecto clastogénico ocasionado por los campos electromagnéticos es aquella llevada a cabo por Nordenson y cols (1984) que al medir daños en el material genético de 20 trabajadores de líneas eléctricas; *in vivo* se observó un incremento significativo en rupturas cromosómicas comparado con el grupo control, pero, al exponer linfocitos en cultivo de sangre periférica a 50 Hz con 1mA/cm², se encontró que no se inducía ningún daño al material genético.

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Nordenson y cols (1988), para evaluar aberraciones cromosómicas y células micronucleadas en 38 trabajadores de una subestación eléctrica, se observó que al ser comparados 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 y cols (1991) informan de 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 1.0T con respecto a aquellas que solo fueron expuestas al fluoruro de sodio.

Sin embargo, Scarfi y cols (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 y cols (1993) a 27 trabajadores no fumadores de líneas eléctricas con una considerable exposición a CEM de 50Hz y 27 no fumadores instaladores de líneas telefónicas como grupo de referencia, mostró que no hubo diferencias en cuanto a formación de cromátides 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.

Asimismo, Scarfi y cols (1993) en un estudio utilizaron linfocitos humanos de 33 donadores sanos, y demostraron que la exposición a 50Hz de CEM sinusoidales sobre un amplio rango de intensidades (0.5-10 kV/m en aire) no aumenta la frecuencia espontánea de MN. Además, estos campos no afectan las mutaciones por MMC, sugiriendo que no producían ningún efecto sinérgico o antagónico.

Scarfi y cols (1994) expusieron cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica a un campo magnético pulsante de 50Hz, 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 y cols (1995) se encontró que la exposición de linfocitos humanos a campos de $140\mu\text{T}$ a 50Hz o a campos de 75 ó $150\mu\text{T}$ a 32Hz, 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 ($42\mu\text{T}$ 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 6hrs de 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 42hrs y disminuía gradualmente de la misma forma en el expuesto al CME así como en el control (Okonogi y cols, 1996).

Por otra parte, pruebas realizadas informan de que campos pulsados de $1300\mu\text{T}$ de intensidad a 100Hz incrementó la formación de MN en linfocitos humanos expuestos durante 72h (Scarfi y cols, 1997).

En un estudio reciente de Simkó y cols (1998) se informa 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 (50Hz y 1mT) 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 a el grupo control en la frecuencia de MN en las células expuestas después de 72h 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 72h 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 al estudiar la inducción de MN así como la proliferación celular en linfocitos humanos de sangre periférica en cultivo, expuestos a un campo magnético sinusoidal de 50Hz por 72h a intensidades de 0.05 a 1.0mT, reportan 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 y cols, 1999).

Han resultado interesantes los estudios realizados no solo con campos electromagnéticos de 60Hz, sino también frecuencias mayores como el llevado a

cabo por Vijayalaxmi y cols (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.

HIPOTESIS

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 60Hz de frecuencia a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0mT en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/C.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto genotóxico de los CEM de 60Hz de frecuencia a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0mT a las 72h 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 60Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0mT más MMC(5mg/kg) a las 72h 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 60Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0mT a los 10 días con 8h 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 60Hz de frecuencia a densidades de flujo magnético de 1.0, 1.5 y 2.0mT a las 72h 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 60Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de 2.0mT más MMC(5mg/kg) a las 72h de exposición mediante el %EPC en médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/C.

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

MATERIAL Y METODO

Material biológico.-

Se utilizaron ratones machos *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, ver Apéndice I)
- Colorante de Wright 0.3% (CTR)
- Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 6.8 (ver Apéndice I)
- Xilol puro
- Alcohol etílico 70%

Equipo de Estimulación Magnética

- Bobina 27x71cm de 552 vueltas de cobre laqueado.
- Autotransformador variable CONTROVAC-AC modelo A8.cp.
- Transformador variable de 140 Volts y 7.5 Ampers
- Osciloscopio de 2 canales marca BK modelo 2120 No. de serie 201-01787.
- Bobina de prueba (calibrada con un gausímetro marca RFL modelo 912)

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)

Modelo Físico de Estimulación Magnética

El material biológico fue colocado en el interior de una bobina que consta de 552 vueltas de alambre de cobre laqueado (calibre N. 14) montado en una matriz de plástico de 27 X 71 cm. Para estabilización y seguridad del sistema, se conectó a un transformador-reductor con alimentación de entrada de 127 Volts(V) \pm 10% con una salida de 12V, este a su vez está unido a un transformador variable que tiene un máximo de 140 V y 7.5 Amperes (A) de salida con una alimentación de 120 V y una frecuencia de 60 Hz (Figura 2)

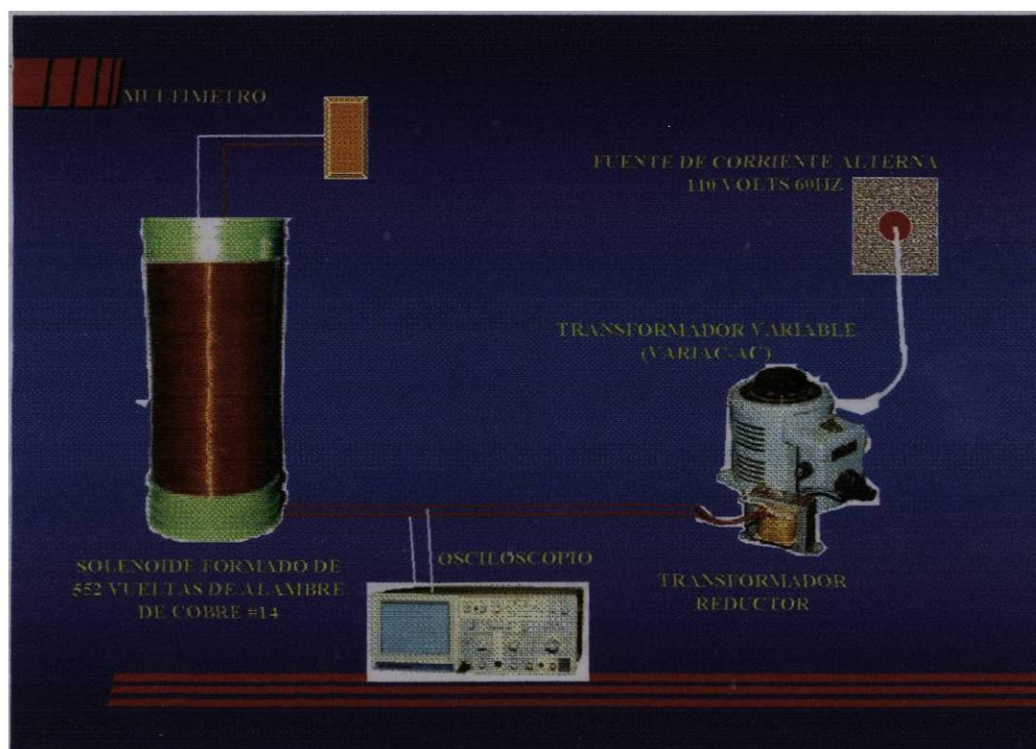


Figura 2.- Sistema de exposición a CEM *in vivo*.

Para llevar a cabo la medición de CEM se utilizó una bobina de prueba; ésta, al ser sometida al campo detecta un voltaje (Fuerza Electromotriz inducida: $FEM_{inducida}$) que es proporcional a la densidad de flujo magnético medido en Teslas. La calibración de la bobina de prueba se llevó a cabo usando un gausímetro con una referencia de 10.1 Gauss (1.01 mT) que es detectado por la bobina de prueba como una corriente alterna de 1.7mV. La $FEM_{inducida}$ para 1.0, 1.5 y 2.0 mT es de 1.08, 2.52 y 3.36 mV respectivamente. Por otra parte, se evaluó la homogeneidad del campo dentro de la bobina.

Los grupos testigo fueron colocados en el sistema anteriormente descrito, solo que éste no fue alimentado con una corriente alterna.

Diseño Experimental

Las dosis de densidad de flujo magnético utilizadas fueron de: 1.0, 1.5, y 2.0mT y además de una exposición combinada a un CEM de 2.0mT más el mutágeno químico Mitomicina C a una concentración de 5mg/kg, el tiempo y tipo de exposición fue aguda de 72h, cada uno comparado con un testigo negativo sin exposición a factores físicos o químicos y un testigo positivo tratado con MMC(5mg/kg). Asimismo, debido a la importancia en lo referente a exposición laboral a CEM se manejó una exposición fraccionada a una intensidad magnética de 2.0mT, ya que ésta es considerada una densidad de flujo magnético presente en las subestaciones eléctricas (Benz y cols, 1987) por un periodo de 10 días una exposición de ocho horas diarias de las 8:00h a las 16:00h 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 repeticiones 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 tres repeticiones.

Tratamiento del Testigo Positivo.-

El uso del compuesto químico Mitomicina C como testigo positivo, es debido al efecto clastogénico conocido que provoca en eritrocitos de médula ósea (Matter y Granwiler, 1975), la concentración elegida fue la de 5mg/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, inyectándolo de forma aséptica por vía intraperitoneal 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 de Schmid (1975), por lo cual primero se procedió al sacrificio del animal el cual 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 3.0ml de medio RPMI más 10 gotas de heparina, se extrajo 2.0ml 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 centrifuga. La muestra se suspendió y fue agitada 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. Posteriormente se agregaron de cuatro a cinco gotas de suero fetal bovino, se resuspendió de nuevo y se colocó una gota de la suspensión a un portaobjetos para llevar a cabo la extensión de la muestra por barrido.

Tinción de Muestras.

Cada portaobjetos con la extensión celular se cubrió en forma horizontal con colorante Wrigth 0.3% con 1% de glicerina por un tiempo de 3min 30seg. A continuación se añadió la solución amortiguadora de fosfatos sobre el colorante dejándolo reposar por 4min 30seg. Se lavó en agua corriente y se secaron con al aire, posterior a esto se introdujeron a Xilol puro por 45seg para aclarar la muestra.

Lectura de Laminillas

La lectura de laminillas se llevó a cabo en un microscopio compuesto al objetivo de inmersión(100x) y se estimó la frecuencia de micronúcleos al contabilizar en 1000 EPC 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 ésta manera expresar el resultado en %EPC.

Definición de variables

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Intensidad del CEM de 1.0, 1.5 y 2.0mT por un tiempo de 72h de exposición.
- Intensidad del CEM de 2.0mT más MMC(5mg/kg) por un tiempo de 72h de exposición.
- Intensidad del CEM de 2.0mT por un tiempo de 10 días con 8h diarias de exposición.

VARIABLES DEPENDIENTES

- Para genotoxicidad la frecuencia de micronúcleos.
- Para citotoxicidad el %EPC.

Análisis Estadístico

Los resultados de la prueba de micronúcleos y %EPC fueron analizados con la ayuda de el paquete de computación SPSS (Statistic Package for the Social Sciences: Nie, 1975; Ferran, 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 Kruskal-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 diferencia significativa se sometieron a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para establecer cuál variable marca la diferencia. Para el caso del %EPC, se aplicó la transformación Arcoseno (Zar, 1996) y se convirtieron los resultados a radianes, y con ésta transformación se distribuyen de forma normal los datos. A los datos transformados se les aplicó un análisis de varianza para establecer la diferencia en cada tratamiento para cada experimento.

RESULTADOS

Los resultados originales obtenidos en cada experimento se presentan en el Apéndice II al final del presente escrito en formato de tablas.

Los resultados del experimento de 1.0mT de intensidad y 72h de exposición se presentan en la Tabla I, en la cual se puede observar que resalta una homogeneidad entre el grupo testigo negativo y el grupo tratamiento ya que éstos no presentaron una diferencia estadísticamente significativa, 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 1.5mT de intensidad magnética y 72h de exposición se encontró que al comparar el grupo tratamiento con el testigo negativo se presentó una diferencia significativa entre ellos, asimismo, se observó una diferencia entre el tratamiento y el testigo positivo como se esperaba éste último por su ya conocido efecto clastogénico. Por otra parte, la proliferación celular no se ve afectada ya que en ésta no se presenta una diferencia al realizar el análisis de los resultados. (Tabla I).

Por su parte, el análisis estadístico de los resultados del experimento de 2.0mT de intensidad y 72h de exposición denotó asimismo 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, éste no es estadísticamente significativo (Tabla I).

En el experimento de 2.0mT de intensidad magnética por 72h combinada 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 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).

EXPERIMENTO	MEDIA DE LA FRECUENCIA DE MN EN 1000 EPC(±DE)	MEDIA %EPC(±DE)
1.0mT	2.00(2.00) b	55.86(3.97)
Testigo (-)	2.33(0.58) b	51.16(3.23)
Testigo (+)	10.00(1.73) a	60.23(7.22)
1.5mT	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)
2.0mT	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)
2.0mT + 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 72h 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 ($p < 0.05$).

Por otra parte, en la Tabla II se muestran los valores promedio de la frecuencia de MN y %EPC de los experimentos fraccionados de 2.0mT de intensidad magnética durante 10 días con 8h 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 2.0mT de densidad de flujo magnético. Por otra parte, no se observó un cambio estadísticamente significativo en la proliferación celular al evaluarla por medio de el %EPC.

EXPERIMENTO	MEDIA DE LA FRECUENCIA DE MN EN 1000EPC(±DE)	MEDIA %EPC(±DE)
Inicial		
2.0mT	13.33(5.03)	54.60(2.43)
Testigo (-)	4.33(2.52)	53.67(6.26)
Replicación a los 6 meses		
2.0mT	15.67(1.53)	61.80(4.65)
Testigo (-)	5.67(3.06)	56.20(6.67)
Replicación a los 12 meses		
2.0mT	11.00(1.00)	53.23(9.22)
Testigo (-)	4.33(1.53)	59.27(2.48)

Tabla I. Resultados iniciales y replicados a los 6 y 12 meses de la evaluación del efecto genotóxico y citotóxico al exponer a CEM de 2.0mT de intensidad por 10 días 8h 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 1.5mT a las 72 horas, sin embargo, a la densidad de flujo magnético de 1.0mT este efecto ya no se presentó. Asimismo, se encontró un efecto antagónico entre un CEM de 2.0mT y el mutágeno Mitomicina-C. La dosis fraccionada que simula una exposición laboral a los CEM de 2.0mT con una duración de 10 días y 8 horas diarias de exposición indicó, al igual que a la 72h, un aumento en la frecuencia de MN. Por otra parte, no se encontró una variación estadísticamente significativa en la proliferación celular estimada por medio de el %EPC.

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

Por el contrario, Scarfi y cols (1993, 1994 y 1999) mencionan que CEM sinusoidales y pulsantes no afectan la frecuencia de MN, asimismo, esto es ratificado por Tofani y cols en 1995 en CEM oscilantes. Tanto las pruebas realizadas por Scarfi y cols (1993 y 1994) se pueden comparar con las hechas por Nordenson y cols (1984) quien al igual que ellos realizó experimentos con cultivos de linfocitos de sangre periférica en los cuales no encuentran un

cambio en la frecuencia de MN, estos resultados cambian notablemente al realizar las pruebas *in vivo*, estas variaciones se interpretan como diferencias de condiciones al realizar las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Asimismo ocurre con la investigación hecha por Tofani y cols (1995) en la cual aparte de la condición anterior, también se observó que se utilizó una intensidad de CEM menor ($150\mu\text{T}$).

Es interesante destacar los resultados presentados por Scarfi y cols (1999) quienes no encuentran efecto genotóxico de los campos magnéticos al exponer cultivos de linfocitos humanos, ya que, al igual que el presente trabajo, a la intensidad magnética de 1.0mT no se presenta el efecto clastogénico observado en las dosis mayores, además, el trabajo realizado por ellos utiliza un rango de intensidad magnética de 0.05 a 1.0mT . Por otra parte, estos autores mencionan un cambio en la proliferación celular lo cual no se observó en médula ósea por medio de la prueba de %EPC.

Otras investigaciones difieren en los resultados respecto a la presente, tal como los resultados obtenidos en la frecuencia de micronúcleos por Vijayalaxmi y cols (1999) solo que éstos al evaluar con radiación electromagnética de banda ultra amplia(REMBUA); y esto podría ser explicado por el cambio de energía electromagnética, lo cual se ha observado en otros estudios como el de Prasad y cols (1984) en el cual se utilizó resonancia magnética nuclear.

En cuanto al efecto antagónico encontrado entre un CEM de 2.0mT con MMC($5\text{mg}/\text{kg}$) se informa d un hallazgo parecido usando un campo magnético estático (CME) con MMC (Okonogi y cols, 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, a diferencia que en el presente estudio los animales fueron expuestos simultáneamente a los dos factores.

En contraste, estudios realizados por Shimizu y cols (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 y cols (1991 y 1993) informan no observar efecto sinérgico o antagónico tanto de un campo magnético pulsante como de un CEM y el mutágeno químico MMC. Sin embargo, Heredia-Rojas (2000) al trabajar con linfocitos humanos en cultivo y evaluar proliferación celular a la misma dosis magnética y combinado con MMC al igual que Caballero-Hernández (2000) pero éste último evaluó aberraciones cromosómicas en espermatozoides primarios de ratón muestran 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 y cols, 1995).

Como ya se mencionó, se realizó un experimento fraccionado que simuló condiciones laborales (10 días, 8h diarias de exposición a 2.0mT) en el cual se observa un aumento en la frecuencia de MN, lo cual ha sido reportado por Nordenson y cols (1984 y 1988) en trabajadores de líneas eléctricas. Por el contrario, un análisis realizado por Valjus y cols (1993) menciona no encontrar diferencias en la frecuencia de MN de trabajadores de líneas eléctricas, sin embargo, informa que ocurre un rompimiento de cromátides lo cual se vislumbra como una alteración clastogénica de un CEM.

Al analizar la proliferación celular por medio de el %EPC se encontró que no ocurren cambios estadísticamente significativos, los cuales también reporta Vijayalaxmi y cols (1999) aunque ellos utilizaron REMBUA.

Es importante observar las diferencias encontradas por Simkó y cols (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 hallazgos controversiales será necesaria la realización de más estudios al respecto tratando de correlacionar al máximo las variables experimentales.

CONCLUSIONES

1. La exposición a campos electromagnéticos de 60Hz de frecuencia a 1.5 y 2.0mT de densidad de flujo magnético durante 72h 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 60Hz de frecuencia y 2.0mT de densidad de flujo magnético a las 72h 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 60Hz de frecuencia y 2.0mT de densidad de flujo magnético durante un período de 10 días con 8h 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 60Hz de frecuencia y 1.0, 1.5 y 2.0mT de densidad de flujo magnético no tienen ningún 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, DR, Carsten, AR, Baum, JW and Kuehner, AV. (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.
- Blackman, CF, Benane, SG and Elliot, DJ. (1988) Influence of electromagnetic fields on the efflux of calcium ions from brain tissue in vitro: a three model analysis consistent with the frequency response up to 50 Hz. *Bioelectromagnetics* 9:215-27.
- 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.
- Caballero-Hernández, D.E (2000) Efecto citogenético de campos electromagnéticos de 60Hz sobre células espermatoogénicas de ratón *Mus musculus* Línea CD1 *in vivo*. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. México. Tesis Inédita.
- Cadossi, R, Zucchini, P, Emilia, G, Franceschi, C, Cossarizza, A, Santantonio, M, Mandolini, G. and Torelli, G.(1991) Effects of low frequency low energy pulsing electromagnetic fields on mice injected with cyclophosphamida. *Exp. Hematol.* 19(3): 19-201

Davis, JG. (1992) Health effects of low-frequency electric and magnetic fields. Oak Ridge Associated Universities.

El Nahas, S. and Oraby, H.A. (1989) Micronuclei formation in somatic cells of mice exposed to 50 Hz electric fields. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 13:107-11.

Fajardo-Gutierrez, A, Garduno-Espinoza, J, Yamamoto-Kimura, L, Hernández-Hernández, M, Gómez-Delgado, A, Mejia-Cartagena SA. and Martínez-García, MC (1993) Reinscince close to high-tension electric power lines and its association with leukemia in children. *Bol. Med. Hosp. Inf.Mex.* 59: 32-8.

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

Fiorani, M, Cantoni, O, Sestili, P, Conti, R, Nicolini, P, Vetrano, F. and Dacha, M. (1992) Electric and/or magnetic field effects on DNA structure and function in cultured human cells. *Mutation Research*. 282:25-9.

Galar-Castelan, I. (1988) Electricidad y magnetismo para estudiantes de ciencias biológicas. Ed. Limusa. 1a. Edición. México. pp. 223-37.

Gorczyńska, E. (1987) The process of myelopoiesis in guinea pigs under condition the static magnetic fields. *Acta Physiology Pol.*, 38: 425-32.

Heredia-Rojas JA, Rodríguez-de la Fuente AO, Velazco-Campos MR, Leal

- Garza CH, Rodríguez-Flores LE, de la Fuente Cortez B.(2000) Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes *in vitro*: sister chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate. Bioelectromagnetics (in press)
- Kato, M, Honma, K, Shigemitsu, T and Shiga, Y. (1993) Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal gland melatonin levels in rats. Bioelectromagnetics 19(2):97-106.
- Kato, M, Honma, K, Shigemitsu, T and Shiga, Y. (1994) Circularly polarized 50 Hz magnetic fields reduces pineal gland and blood concentrations of Long Evans rats. Neurosci Lett. 166(1):59-62.
- Khalil, A.M. and Qassem, W. (1991) Cytogenetics effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes *in vitro*: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics. Mutat. Res. 247:141-46.
- Liburdy, R.P. (1992) Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel. FEBS Letters 301(1):53-9.
- Livingston, GK, Witt, KL, Gandhi, OP, Chatterjee, I. and Roti-Roti, J.L. (1991) Reproductive integrity of mammalian cells exposed to power frequency to electromagnetic fields. Environ. Mol. Mut. 17: 49-58.

- Lorimore, SA, Kowalczyk, A, Sanders, RD and Wright, EG (1990) Lack of acute effects of 20 mT 50 Hz magnetic fields on murine hematopoiesis. *Int. J. Radiat Biol.* 58(4): 713-23.
- Macklis, R.M. (1993) Magnetic healing quackery, and the debate about the health effects of electromagnetic fields. *Analysis of Internal Medicine.* 118:376-83
- Matter, BE 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. *Mutation Research.* 29:198-99
- Mishima, S.(1988) The effects of long-term pulsing electromagnetic fields stimulation on experimental osteoporosis of rats. *Sangyo Ika Daigaku Zasshi.*10(1): 31-45
- Mitnik, L, Heller, C, Prost, J. and Viovy, JL (1995) Segregation in DNA solutions induced by electric fields. *Science.* 267: 219-22
- Montes de Oca-Luna, R. (1982) Micronúcleos 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.
- Morales-Matamoros, O (1997) Campos electromagnéticos y salud humana- Informe Instituto Costarricense de Electricidad (ICE). San José, Costa

Rica.

Nie N.H, Hull, CH, Jenkins, SG, Steinbrenner, K. and Bent, DH (1975) Statistical package for the social sciences (SPSS). Mc Graw Hill. Second Edition. pp. 293-300

Nordenson, I, Mild KH, Nordstrom, S, Sweins, A, and Birke E (1984) Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electric fields: *in vivo* and *in vitro* studies. Radiat Environ Biophys. 23(3):191-201.

Nordenson, I, Milt, KH, Ostman, U and Ljunberg, H. (1988) Chromosomal effects on lymphocytes of 400 kV substation workers. Radiat. Environ. Biophys. 27(1): 39-47.

Nordenson, I, Mild, K.H, Andersson, G and Sandström, M (1994) Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty Hertz magnetic fields. Bioelectromagnetics. 15(4):293-01

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(3):209-15.

Parker, S.P. (1993) Encyclopedia of Physics. Second Edition. McGraw- Hill. U.S.A.pp. 337-39

- Pothakamury, UR, Barletta, BJ, Barbosa, GV y Swanson, BG (1993) Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 33:479-89.
- Prasad, N, Bushong, SC, Thornby, JL, Bryan, RN, Hazlewood, CF and Harrell, JE (1984) Effect of nuclear magnetic resonance on chromosomes of mouse bone marrow cells. *Magn. Reson. Imaging*. 2(1): 37-9
- Reese, JA, Jostes, RF and Frazier, ME (1988) Exposure of mammalian cells to 60 Hz magnetic or electric fields: Analysis for DNA single-strand breaks. *Bioelectromagnetics*. 9:237-47.
- Rooney, DE and Czepulkowski, BH (1992) *Human cytogenetics. A practical approach*. Vol. II Oxford University Press. N.Y. USA
- Scarfi, MR, 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(1):194-200
- Scarfi, MR, Bersani, F, Cossarizza, A, Monti, D, Zeni, O, Lioi, MB, Franceschetti, G, Capri, M and Franceschi, C (1993) 50 Hz AC sinusoidal electric fields do not exert genotoxic effects (micronucleus formation) in human lymphocytes. *Radiation Research*. 135(1): 64-68

Scarfi, MR, Lioi, MB, 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. *Mutation Research*. 306:2 129-33.

Scarfi, MR, Lioi, MB, 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, MR, Lioi, MB, 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(3):244-50.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research* 31:9-15

Schreiber, GH, Swaen, GM, Meijers, JM, Slangen, JJ and Sturmans, F (1993) Cancer mortality and residence near electricity transmission equipment: a retrospective cohort study. *International Journal of Epidemiologists*. 22(9):1539-582

Shimizu, H, Li, J, Suzuki, Y and Seki Y (1991) The effects of magnetic field on the micronucleus inducibility of sodium fluoride. *Mutation Research*. 252:107-10

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(2-3):101-11

Stewart, JR (1979) Electric and magnetic fields concepts. Tutorial course. Power Technologies, Inc. pp.:4-10.

Strzhizhovski, AD, Galaktionova, GV, Cheremnykh, PA (1979) Effect of strong, infralow-frequency magnetic fields on bone marrow cell division. Kosm. Biol. Aviakosm. Med. 13(6):61-3

Thomson, RA, Michaelson, SM and Nguyen, QA (1988) Influence of 60-Hertz magnetic fields on leukemia. Bioelectromagnetics. 9(2):149-58.

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

US Congress, Office of technology assessment. (1989) Biological effects of power frequency electric and magnetic fields-background paper. OTA-BP-E-53 Washington DC: US Government Printing Office.

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. Radiation Environ. Biophys. 32(4): 325-36

Vijayalaxmi, Seaman, RL, Belt, ML, Doyle, JM, Mathur, SP and Prihoda TJ

- (1999) Frequency of micronuclei in the blood and bone marrow cells of mice exposed to ultra-wideband electromagnetic radiation. *Int J Radiat Biol.* 75(1):115-20.
- Walleczek, J and Budinger, TF. (1992) Pulsed magnetic fields effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity. *FEBS Letters*, 314(3):351-5.
- Wertheimer, CL and Leeper, E. (1979) Electrical wiring configuration and childhood cancers. *American Journal of Epidemiology.* 109:273-84.
- Wood, R. (1991) *Magnetismo. De la brújula a los Imanes Superconductores.* 1a. Edición. McGraw-Hill. Capítulo 12: Biomagnetismo. pp. 165-73
- Zar JH, (1996) *Biostatistical analysis.* Third edition. Prentice-Hall Inc. Chapter 13: Data transformations. USA. pp. 282-84.
- Zwingelberg, R, Obe, G, Rosentnal, M, Mevissen, M, Butenkotter, S and Loscher, W (1993) Exposure of rats to 50 Hz, 30-mT magnetic field influences neither the frequencies of sister-chromatid exchanges nor proliferation characteristics of cultured peripheral lymphocytes. *Mutat. Res.* 302:2 39-44

APENDICES

APENDICE I

Mitomicina c:

Lote 41F-0239.

Se disuelve el frasco de 0.5 grs en 5.5 ml de suero fisiológico para lograr la concentración de 5mg/kg.

Amortiguador de fosfatos:

Na_2HPO_4	0.06 M	0.852 grs.
---------------------------	--------	------------

KH_2PO_4	0.06M	0.816 grs.
--------------------------	-------	------------

Se disolvió cada uno por separado en 100 ml de agua destilada. Posteriormente se mezclan en partes iguales, se ajusta el pH a 6.8.

APENDICE II

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 1.0 mT	4	59.0%
	2	57.2%
	3	51.4%
Testigo (+)	9	58.4%
	9	54.1%
	12	68.2%
Testigo (-)	2	52.4%
	2	53.6%
	3	47.5%

Tabla 1.- Resultados del experimento de 1.0 mT de intensidad por 72 horas

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 1.5 mT	6	55.2%
	4	47.2%
	6	59.8%
Testigo (+)	9	58.4%
	9	54.1%
	12	68.2%
Testigo (-)	2	52.4%
	2	53.6%
	3	47.5%

Tabla 2.- Resultados del experimento de 1.5 mT de intensidad por 72 horas

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 2.0 mT	29	54.9%
	22	53.2%
	25	57.6%
Testigo (+)	18	56.4%
	18	58.8%
	23	58.3%
Testigo (-)	5	52.7%
	6	51.8%
	10	56.8%

Tabla 3.-Resultados del experimento de 2.0 mT de intensidad por 72 horas

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 2.0 mT + MMC	8	60.0%
	9	54.8%
	8	64.4%
Testigo (+)	10	57.0%
	13	52.8%
	16	60.4%
Testigo (-)	7	68.8%
	7	61.0%
	4	64.4%

Tabla 4.- Resultados del experimento de 2.0 mT de intensidad más MMC por 72 horas

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 2.0 mT	18	53.0%
	14	53.4%
	8	57.4%
Testigo (-)	7	60.6%
	4	52.0%
	2	48.4%

Tabla 5.- Resultados del experimento de 2.0 mT de intensidad por 10 días con 8 horas diarias de exposición.

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 2.0 mT	16	66.8%
	14	57.6%
	17	61.0%
Testigo (-)	8	52.5%
	6	63.9%
	12	52.2%

Tabla 6.- Resultados del experimento de 2.0 mT de intensidad por 10 días con 8 horas diarias de exposición, replicación a los 6 meses).

Tratamiento	Frec. de MN en 1000 EPC	%EPC
CEM 2.0 mT	12	52.5%
	11	44.4%
	10	62.8%
Testigo (-)	3	63.5%
	4	59.3%
	6	55.0%

Tabla 7.- Resultados del experimento de 2.0 mT de intensidad por 10 días con 8 horas diarias de exposición, replicación a los 12 meses).

