

76 16982

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO CITOGENETICO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS DE 60 HERTZ SOBRE LINFOCITOS HUMANOS *in vitro*

TESIS

QUE EN OPCION AL TITULO DE QUIMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO.

PRESENTA

ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE



TL
QP82
.2
.E43
R63
1998
c.f.

MARZO DE 1998

UNIVERS

FACU

EFECTO CITOGEN
DE 60 HERT

QUE EN OPCIO

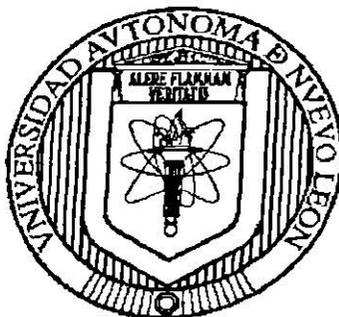
ADDAUAN

TL
QP82
.2
.E43
R63
1998
c.1

76^{16 8}

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO CITOGÉNICO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS
DE 60 HERTZ SOBRE LINFOCITOS HUMANOS *in vitro***

TESIS

**QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE QUÍMICO BACTERIOLOGO
PARASITOLOGO.**

PRESENTA

ABRAHAM OCTAVIO RODRIGUEZ DE LA FUENTE

MONTERREY, N.L.

MARZO DE 1998

27

SMUR R I E 00
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

¡La falta, querido Bruto, no está en nuestras estrellas, sino en nosotros mismos!

William Shakespeare

“ Nada en el mundo puede sustituir la constancia. El talento no puede hacerlo; nada es más común que hombres talentosos sin éxito. Tampoco el genio; el mundo esta lleno de ruinas muy bien educadas. Solo la constancia y la determinación son omnipotentes. El consejo de seguir adelante ha resuelto hasta ahora, y lo seguirá haciendo, todos los problemas de la raza humana ”

Calvin Coolidge

Dos amigos conversan:

Pedro : Dime, Jesús, ¿cómo le haces para saber siempre lo que tienes que hacer en toda situación?

Jesús: Bueno supongo que lo hago porque tengo lo que se llama buen juicio

Pedro: Pero ¿cómo lo conseguiste?

Jesús : Con la experiencia Pedro, con la experiencia.

Pedro: Si, pero ¿cómo se obtiene la experiencia?

Jesús :Con el mal juicio Pedro, con el mal juicio.

Autor anónimo

**Mejores son las heridas que vienen del amigo,
que los besos fingidos del enemigo.**

Proverbios XXVII, 6

**Cuando un hombre nace
Su naturaleza es fundamentalmente buena
La naturaleza humana es similar
Solo el ambiente la hace diversa**

Párrafo obtenido de ‘El clásico de las tres palabras’

DEDICATORIA ESPECIAL

AL DR. RIGOBERTO GARCIA CANTU QUE ES UN EXCELENTE SER HUMANO QUE TUVO DISPONIBILIDAD CONTINUA EN APOYARME CUANDO MAS LO NECESITABA Y QUE ES EL MEJOR MAESTRO EN FISICA DE LOS CAMPOS MAGNETICOS Y METROLOGIA QUE HE CONOCIDO .

MUCHAS,MUCHAS GRACIAS DOCTOR!

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	4
HIPOTESIS.....	15
OBJETIVO	15
MATERIAL Y METODO.....	16
RESULTADOS	21
DISCUSION.....	23
CONCLUSIONES.....	25
LITERATURA CITADA.....	26
EQUIPO.....	APENDICE I
CRISTALERIA Y VARIOS.....	APENDICE II
PREPARACION DE SOLUCIONES	APENDICE III
FIGURAS	APENDICE IV
TABLAS.....	APENDICE V

RESUMEN

A medida que avanza la tecnología el ser humano está cada vez más expuesto a campos electromagnéticos tanto ocupacionales como domésticos.

Debido a la controversia que han arrojado los informes sobre la posible relación de los campos electromagnéticos (CEM) y el incremento en la incidencia de leucemias y cánceres tanto en niños como adultos, es de gran importancia determinar cual sería el efecto citogenético que pueden ocasionar los CEM.

En el presente estudio se evaluó el potencial genotóxico de CEM oscilantes de 60 Hertz de frecuencia sobre linfocitos humanos periféricos cultivados *in vitro*. Mediante el análisis citogenético de Intercambio de Cromatidas Hermanas (ICH), se midió la frecuencia de ICH, Índice Mitótico (IM), Índice Proliferativo (IP) y Tiempo Promedio de Generación (TPG), de cultivos que fueron expuestos a tres intensidades magnéticas (1.0, 1.5, y 2.0 miliTeslas). Cada intensidad representó un experimento individual y fue aparejado con un testigo positivo (linfocitos expuestos al mutágeno Mitomicina-C, 10^{-7} M) y un testigo negativo no expuesto a factores físicos ni químicos. Asimismo se realizó un experimento que combinó la acción del CEM de 2.0 miliTeslas y la Mitomicina-C con objeto de detectar algún posible efecto sinérgico. Cada uno de los tratamientos y sus respectivos testigos incluyeron tres repeticiones. Se compararon los datos obtenidos mediante pruebas estadísticas paramétricas y no-paramétricas.

Para la variable ICH cuya distribución fue normal, se utilizó el análisis de varianza y la comparación múltiple de medias de Tukey. Para las otras tres variables; IM, IP y TPG se utilizó el análisis no-paramétrico de Kruskal-Wallis y la prueba de U de Mann-Whitney; ya que su distribución no fue normal, esto se constató mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se encontró que los CEM no aumentaron la frecuencia de ICH con respecto al testigo en ninguna de las intensidades magnéticas probadas, asimismo no se encontró un efecto sinérgico de los CEM y la Mitomicina para esta variable.

Por otro lado, se observó que los CEM alteraron la cinética de división celular ya que en todas las intensidades magnéticas se incrementó la velocidad de división de las células; se elevó significativamente el IM, IP, y disminuyó el TPG ($p < 0.05$). Para estas variables, se observó también que los CEM tienen un efecto antagónico con respecto a la Mitomicina-C la cual deprime la división celular.

Del presente estudio se puede concluir que: a) Los CEM oscilantes de 60 Hertz en intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 miliTeslas no modifican la frecuencia de ICH de linfocitos humanos expuestos *in vitro*, b) Los CEM incrementan la velocidad de división de los linfocitos en todas las intensidades probadas y c) Los CEM presentan un efecto antagónico al producido por Mitomicina-C en los cultivos de linfocitos.

INTRODUCCION

Aún antes de la aparición de los aparatos eléctricos y líneas de alta tensión, ya existían en nuestro planeta las radiaciones electromagnéticas producto de la radiactividad natural y de los rayos cósmicos.

A medida que avanzó la tecnología, aparecieron nuevas fuentes de campos electromagnéticos (CEM) en el ambiente y los seres vivos ahora nos vemos expuestos a esta energía. Se ha sugerido que los CEM son potencialmente peligrosos, el acoplamiento de esta radiación al organismo no es muy sencillo de establecer y depende de una variedad de factores tales como la frecuencia, dirección, distancia y aún de la postura corporal. Se sabe que los campos eléctricos y magnéticos afectan partículas con carga y el organismo por su parte posee una diversidad de partículas cargadas en forma de iones, por lo tanto, es lógico pensar que pueden suceder cambios por la presencia de estos campos en los sistemas biológicos.

Recientemente se han informado diversos efectos de los CEM sobre los sistemas biológicos. Algunos efectos son benéficos (reparación ósea, destrucción de células malignas e inactivación de microorganismos), pero también se tienen sospechas de que causan efectos dañinos como leucemia infantil, cáncer de mama, cáncer cerebral etc.

Por otro lado, debido a la controversia que han arrojado los resultados obtenidos sobre la posible relación de los CEM y su efecto genotóxico, es de gran importancia determinar cuáles son los efectos reales que pueden ocasionar los CEM a nivel citogenético, así como también contribuir a explicar los mecanismos mediante los cuales los CEM de 60 Hz¹ pueden afectar la salud del humano, ya que la población está continuamente expuesta a éstos, los cuales se producen por aparatos eléctricos domésticos y de trabajo.

En el presente estudio se pretende evaluar el efecto de los CEM oscilantes de 60 HZ de frecuencia y de intensidad 1.0, 1.5 y 2.0 mT² sobre cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro*, mediante las pruebas citogenéticas de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), Índice Mitótico (IM), Tiempo Promedio de Generación (TPG) y Cinética de Proliferación Celular (CPC).

1.- 1 HZ = 1 ciclo/seg y es la unidad para medir la frecuencia de las radiaciones en el Sistema Internacional de Unidades.

2.- 1 Tesla y es la unidad para medir intensidad magnética

ANTECEDENTES

CAMPOS ELECTROMAGNETICOS

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

La región en el espacio en la cual un objeto magnetizado puede a su vez magnetizar a otros cuerpos se llama campo magnético. La configuración de este campo puede obtenerse con el auxilio de una brújula o con limaduras de hierro . Si se rompe un imán en un intento de separar los polos, se encuentran otros nuevos formados en los extremos rotos. Si uno de esos pedazos se rompe, otra vez aparecen de nuevo dos polos de clase opuesta. Tantas veces como se repita este proceso se tendrá el mismo resultado. No es posible obtener un polo magnético aislado (Stewart, 1979).

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

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

Cuando los campos magnético y eléctrico, en una determinada región, varían con el tiempo, ambos estan estrechamente relacionados. Es decir, todo campo eléctrico que varía con el tiempo va siempre acompañado de un campo magnético tambien variable y, a la inversa, si se produce uno de éstos, va acompañado de otro campo eléctrico asimismo variable. Esta interrelación entre los campos eléctricos y magnéticos hace que se hable más bien de un campo electromagnético (CEM) como una sola entidad fisica (Parker, 1993).

Los CEM pueden clasificarse en homogéneos, heterogéneos, estáticos y oscilantes. En un campo magnético homogéneo, la intensidad es uniforme en el

área dentro de la bobina, mientras que en uno heterogéneo es variable; un campo magnético estático implica que la intensidad y dirección del campo son constantes en el tiempo, mientras que en uno oscilante alterna la carga y dirección en cada pulso a la vez que la intensidad de éstos es también variable (Pothakamury, 1993).

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

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas (como aquellas de los circuitos domésticos de 60 Hz) irradian muy poca energía ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo; los rayos X y gamma. Queda entonces claro que las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que produzcan deberan ser por mecanismos diferentes a aquellos que involucran el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas blanco (Strother, 1980, Rojo, 1981).

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

CITOGENETICA

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

La mitosis puede dividirse en etapas, el proceso global no es continuo y no ocurre en partes separadas. Se divide en las siguientes fases:

PROFASE: En esta etapa es posible observar los cromosomas duplicados, además se comienza a formar el huso entre los dos centriolos y la envoltura nuclear prácticamente ha desaparecido.

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

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

TELOFASE: Los cromosomas hijos se han separado por completo, comienza a reaparecer la membrana nuclear. Las dos células nuevas se separan y sus núcleos, una vez más pasan a la siguiente interfase (Emery , 1981).

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

Hay 46 cromosomas en cada célula humana y cada cromosoma es un miembro de un par homólogo. Existen por lo tanto, 23 pares de cromosomas en cada célula: un miembro de cada par procede del padre del individuo, y el otro de la madre. Veintidos pares son iguales en los machos y hembras y se denominan autosomas, pero el par restante, los cromosomas sexuales, difieren en ambos sexos, y son de gran importancia en la determinación de aquél. En la hembra humana, los cromosomas sexuales son también idénticos y se denominan cromosomas X. En el macho humano, los dos cromosomas sexuales son muy diferentes: uno posee una forma igual al cromosoma femenino X, el otro mucho más pequeño, se denomina cromosoma Y (Thompson y cols., 1968).

El estudio cuidadoso de una metafase revela que los cromosomas difieren en tamaño, lo que permite clasificarlos en grandes, medianos y pequeños. Por otra parte, la posición del centrómero, que es el elemento que une las dos cromátides, es variable: puede encontrarse casi a la mitad del cromosoma, en cuyo caso recibe el nombre de metacéntrico, o cerca de la parte terminal, y entonces se trata de un acrocéntrico, o finalmente puede ocupar una posición media entre la parte central y posición terminal, constituyendo así el cromosoma llamado

submetacéntrico. Con estos dos parámetros, tamaño de los cromosomas y posición del centrómero, fué posible ordenar en forma convencional el cariotipo humano normal y a la vez hacer la clasificación de las variaciones patológicas del mismo (González-Ramos, 1985).

TECNICA CITOGENETICA PARA DETERMINAR LOS INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH)

Al inicio de la década de los 70, se desarrollaron trabajos clásicos como aquellos de Zakharov y Egolina, de Latt y de Perry, que establecieron una metodología que permitía la tinción diferencial de las cromátidas. El procedimiento consiste en adicionar al medio de cultivo, 24 horas después de la siembra, una base análoga de 5 Bromodeoxiuridina (BrdU), la cual es incorporada en las células en vez de la timina. Aquellas cromátidas que difieren en el número de cadenas de ADN que han sido sustituidas por BrdU pueden distinguirse fácilmente si los cromosomas se ponen en contacto con el fluorocromo de Hoescht 33258, que tiñe el ADN normal pero no aquel cuyas dos cadenas han sido sustituidas por BrdU (Salamanca, 1990).

El intercambio de cromátidas hermanas resulta del rompimiento y unión de ADN en sitios aparentemente homólogos de dos cromátidas de un cromosoma, esto fue visualizado por primera vez al utilizar timidina tritiada para marcar el ADN en células en división (Taylor, 1970).

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

La técnica para determinar el ICH es relativamente simple, ésta prueba es ampliamente usada en estudios de toxicología genética. Mediante este procedimiento se ha demostrado que la frecuencia de ICH es aumentada dramáticamente cuando células o animales (incluyendo al humano), son expuestos a mutágenos y carcinógenos conocidos (Perry y Evans, 1975; Latt y cols., 1981; Lambert y cols., 1982).

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

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

Por otra parte los estudios realizados por diversos grupos (Perry y Evans, 1975; Steka y Wolff, 1976; Raposa, 1978) muestran que varios clastógenos fuertes son capaces de inducir un incremento en la frecuencia de ICH por lo que ésta técnica se empezó a utilizar en la detección de mutágenos tanto *in vivo* como *in vitro*. Los primeros estudios indicaron que la prueba tenía una alta sensibilidad, ya que se requerían concentraciones mucho menores de una sustancia para inducir intercambio de cromátidas hermanas que para producir aberraciones cromosómicas. Estudios posteriores han demostrado que esta alta sensibilidad se presenta en la mayoría de los casos cuando se usan agentes alquilantes, pero no es tan sensible cuando se utilizan otros agentes químicos.

Una ventaja adicional del análisis citogenético de intercambio de cromátidas hermanas, es que además de poderse evaluar la frecuencia de éstas, es posible medir otros parámetros que son indicadores del grado de proliferación celular. Así por ejemplo, contabilizando las células que se encuentran en primera, segunda y tercera división se estima la cinética de proliferación celular. Esto último se hace observando células cuyas dos cromátidas se encuentran teñidas de oscuro se encuentran en primera división, aquellas con una cromatida teñida y otra no, o sea un cromosoma como "arlequín" se consideran en segunda división y aquellas metafases en que las dos cromátidas se tiñen claro se clasifican en tercera división. En la figura 2 se puede apreciar un esquema que ilustra lo anterior. La cinética de proliferación celular es considerada como un biomarcador para determinar agentes tóxicos (Dean y cols., 1985), y se piensa que uno de los mecanismos por el cual los compuestos químicos pudieran afectar las células, es por la interacción con moléculas claves en la superficie de los linfocitos (Synder y Valle, 1991).

Otro parámetro que se determina junto con la cinética de proliferación celular es el índice mitótico, el cual consiste en determinar el porcentaje de células que están en mitosis. El índice mitótico ha sido utilizado para la evaluación del crecimiento de cultivos desde los años 60, pero recientemente ha vuelto a ser utilizado en la investigación de mecanismos de toxicidad sobre todo de fármacos antineoplásicos con actividad citotóxica (Rojas y cols., 1992).

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS

Las ondas de radio y algunos tipos de luz ultravioleta, son algunas radiaciones no ionizantes a las que el hombre está frecuentemente expuesto. Los efectos biológicos de las primeras están siendo determinados en la actualidad, mientras que el daño que produce la luz ultravioleta en el ADN se ha relacionado con la formación de dímeros de timina, que es la lesión más frecuentemente inducida por ésta radiación, por lo general, estos daños son eliminados por las células a través de mecanismos de reparación por excisión. Si las células

expuestas no son eficientes en este tipo de reparación, el daño al ADN permanecerá y la célula sufrirá alteraciones considerables como en el caso del *Xeroderma pigmentosum* y del cáncer en la piel (Brusik, 1987).

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

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

También se han obtenido evidencias experimentales que sugieren que los CEM afectan el crecimiento y la síntesis de ADN en varios tipos de células (Cantini y cols., 1987; Goodman y cols., 1983; Liboff y cols., 1984; McLeod y cols., 1987; Rodan y cols., 1978; Takahashi y cols., 1987; Yen Patton y cols., 1988).

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

Se ha evaluado también el efecto de los CEM y eléctricos en embriones. En un estudio, se expusieron ratones C3H/He machos, a un campo eléctrico de 20 kV/m de 50 Hz de frecuencia por dos semanas. Después, a cada ratón macho lo aparearon con 2 hembras diferentes cada semana durante un período de 8 semanas para que las hembras fueran preñadas por los ratones que habían sido expuestos al campo eléctrico y no encontraron diferencia significativa en la sobrevivencia de los embriones (Kowalczyk y cols; 1990).

También en otro estudio Nordstrom y cols. (1983) encontraron un incremento en la frecuencia de malformaciones congénitas en niños cuyos padres trabajaban en fuentes generadoras de alta tensión, lo cual podría indicar, efecto a nivel genético de los CEM.

Por otra parte, es bien sabido que los CEM de baja frecuencia pueden producir una variedad de efectos benéficos en los sistemas biológicos. Los campos magnéticos pulsantes por ejemplo, son usados para la reparación de fracturas óseas. El investigador C.A.L. Basset del Depto. de Cirugía Ortopédica de

la Universidad de Columbia en Nueva York, publicó en la revista Ingeniería Biomédica en el año de 1989, un artículo titulado "Aspectos prácticos y fundamentos de usos terapéuticos de campos electromagnéticos pulsados". En este trabajo mostró que el tejido óseo es sensible a campos magnéticos y eléctricos de baja frecuencia. Primero se sometió al tejido a un campo magnético variable de baja frecuencia y se detectó que en el tejido se inducía una corriente, ya que la lectura del voltímetro se modificaba en presencia de dicho campo. De este modo se inició el estudio de la posible utilización de campos magnéticos para la terapia de fracturas persistentes y en algunos casos de osteoporosis (Andrew y cols., 1989).

CAMPOS ELECTROMAGNETICOS Y CANCER

Recientemente se ha discutido la posible relación de la exposición a CEM con el desarrollo de leucemia aguda y se ha propuesto una relación entre la forma de exposición al campo magnético en niños y adultos, sin embargo, no se han definido bien a los CEM como causantes de cáncer (Brandt, 1985).

Asimismo, en varios estudios epidemiológicos se ha correlacionado la exposición de los humanos a campos electromagnéticos con una alta incidencia de cáncer (Coleman y cols., 1983; McDowall, 1983; Milham, 1982, 1985; Pearce y cols., 1988; Tomenius y cols., 1982; Wertheimer and Leeper, 1979; Wright y cols., 1982).

En contraste, Costa y cols. (1987) descubrieron que campos magnéticos de alta intensidad, en el intervalo 1 a 50 T, con una frecuencia de 5 a 1000 KHz, reducen la concentración de células malignas en tejido animal. Por lo general, para el tratamiento del cáncer, el tejido enfermo se somete de 1 a 1000 pulsos, de $100\mu s$ a un segundo de duración dependiendo del tipo de tumor. El efecto de este tratamiento es la reducción en el número de células malignas; después se aplica la quimioterapia. La ventaja es que no se genera calor en el tejido y aunque el tejido normal también sufre alteración, el cambio es menor comparado con el efecto que tiene en las células cancerosas. En adición, las células del sistema inmunológico no se afectan con el tratamiento por lo que el efecto neto en el organismo es favorable.

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

cáncer. De acuerdo a lo anterior los CEM actuarían más bien como promotores que como iniciadores, ya que acelerarían el proceso de desarrollo de cáncer más que inducirlo directamente.

En un estudio experimental Loescher y cols. (1993) por su parte, indujeron tumores mamarios en ratas utilizando el 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA) a un grupo de 99 ratas hembras para luego exponer a campos magnéticos de 100 μ T por 24 horas diarias durante 7 días; otro grupo de 99 ratas fue utilizado como testigo bajo las mismas condiciones ambientales que el grupo expuesto al tratamiento. Los resultados indicaron que las ratas hembras tratadas con DMBA, expuestas por un largo período a campos magnéticos de baja densidad promueven el crecimiento e incidencia de tumores mamarios malignos.

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

Por otro lado, se ha sugerido que el riesgo de leucemia infantil puede estar relacionado con los efectos combinados de campos magnéticos estáticos y de campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja. También se han realizado estudios epidemiológicos que han demostrado el incremento del riesgo a padecer leucemia en niños que viven cerca de líneas de distribución eléctrica (Bowman y cols., 1995; Blank, 1995).

También Antonopoulos y cols (1995) han sugerido que los CEM tienen relación con el cáncer, para esto, ellos incubaron cultivos de sangre periférica en presencia de un CEM de 5 mT y 50 Hz de frecuencia. Los resultados obtenidos indicaron que los efectos carcinogénicos originados por CEM no son de tipo iniciador, pero probablemente tengan efectos promotores.

POTENCIAL GENOTOXICO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS

En lo que concierne a los efectos genotóxicos de los CEM, se han realizado una gran diversidad de estudios en diferentes organismos desde bacterias hasta mamíferos, incluyendo al hombre. Por ejemplo, en un estudio reciente se expuso a *Salmonella typhimurium* previamente expuesta a azida (mutágeno químico) a un CEM de 2 Gauss y de 60 Hz de frecuencia, y se encontró un incremento de 14% en la tasa de mutación (Tabrah y cols., 1994).

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

Kowalczyk y cols. (1996) investigaron el potencial mutagénico usando un ensayo letal dominante en ratones. Un total de 42 ratones machos fueron expuestos por 8 semanas a un CEM de 10 mT de 50 Hz de frecuencia y 47 ratones machos fueron manejados como grupo control. Cada macho se apareó con 2 hembras en la primera, tercera, quinta, séptima y novena semana después de la exposición al campo magnético. Ellos informaron que las exposiciones a campos magnéticos de 10 mT n , no parecen inducir mutaciones letales en las células germinales de ratón macho.

Sin embargo Galt y cols. (1995) probaron el efecto de un CEM de 30 μ T de 50 Hz sobre células amnióticas humanas durante un período de exposición de tres días, con el fin de confirmar los experimentos realizados por Nordenson y colaboradores en los cuales el rompimiento de cromosomas y la formación de gaps era relativamente alta después de la exposición. Pero ellos no encontraron incremento de daño a los cromosomas en las células expuestas a campos electromagnéticos.

En lo que respecta al efecto en cromosomas, Nordenson y cols. (1994) expusieron células amnióticas de humano a un campo magnético sinusoidal de 30 μ T y de 50 Hz por espacio de 72 h y encontraron un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas comparado con un grupo no expuesto.

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

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

Por otra parte, el modelo de trabajo con linfocitos humanos ha sido ampliamente utilizado para probar el efecto de diversos agentes mutagénicos. Recientemente se han utilizado los linfocitos para investigar los posibles efectos genotóxicos de los CEM. Varias técnicas han sido desarrolladas para probar el efecto de diversos agentes químicos y físicos sobre el material genético a este nivel (Morhead, 1960; Perry y Evans, 1975; Fenech y Morley, 1985).

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

Sin embargo, en otra investigación se analizaron linfocitos humanos periféricos de 32 trabajadores ocupacionalmente expuestos a transformadores que generan campos magnéticos intensos por más de 20 años y no se encontraron cambios en la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni de el intercambio de cromátidas hermanas (Bauchinger y cols., 1981).

En otro trabajo, se expusieron linfocitos humanos *in vitro* a campos electromagnéticos de 2.5 mT. Los resultados obtenidos no demostraron efecto genotóxico ocasionado por los mismos (Bersani y cols, 1988).

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

Sin embargo otros investigadores estudiaron el efecto *in vitro* de los campos electromagnéticos pulsantes de 10, 20 y 40 Gauss por 48 horas sobre linfocitos humanos periféricos, utilizando la prueba citogenética de intercambio de cromátidas hermanas y no encontraron diferencia estadísticamente significativa entre los grupos expuestos a CEM y el testigo (García-Sagredo y cols., 1990).

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

Por otra parte, Scarf y Franceschetti (1991) realizaron exposiciones a campos eléctricos (0.5,2.0,5.0 kV/m) de 50 Hz para ver si estos producían efecto genotóxico (estudiando la formación de micronúcleos) *in vitro*, también se probaron campos eléctricos y Mitomicina(agente clastogénico). Pero ellos

encontraron que los campos eléctricos de 50 Hz de frecuencia no producen efectos genotóxicos a nivel cromosómico.

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

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

Recientemente fueron expuestos linfocitos periféricos humanos a campos magnéticos estáticos y oscilantes, para luego utilizar la prueba citogenética de micronúcleos y determinar el daño producido por agentes genotóxicos a los cromosomas. El primer grupo se expuso a un campo magnético de 150 μ T de 50 Hz y de 75 y 150 μ T de 32 Hz con el campo geomagnético estático nulificado. En el segundo grupo, las células fueron expuestas a 75 y 150 μ T de 32 Hz junto con un campo magnético estático de 42 μ T. Se encontró un incremento de micronúcleos estadísticamente significativo con respecto a un testigo cuando se exponían linfocitos a campos magnéticos estáticos y oscilantes (Tofani y cols, 1995).

HIPOTESIS

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

OBJETIVO

Evaluar el efecto de los campos electromagnéticos de 60 Hz sobre linfocitos humanos *in vitro* en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, cinética de proliferación celular e índice mitótico.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL BIOLÓGICO:

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

EQUIPO Y REACTIVOS.

El equipo, cristalería y la preparación de reactivos aparece en los apéndices I, II y III.

CULTIVOS DE SANGRE VENOSA.

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

Posteriormente los cultivos se incubaron a 37°C. A las 24 hr se agregó 1 ml de 5'-Bromodeoxiuridina (20 ug/ml) y se mantuvieron en oscuridad. Cumplidas las 72 hr se añadió 0.1 ml de colchicina (3.9 ug/ml) durante 1 hr. Después el contenido de los frascos se pasó a tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente la pastilla celular con 5 ml de KCl 0.075 M con una pipeta Pasteur y por 20 minutos se mantuvieron a 37°C, enseguida se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron con 5 ml de solución fijadora (metanol-ácido acético 3:1). El lavado con la solución fijadora se repitió hasta que se obtuvo un botón blanco, el cual se resuspendió en 1 ml de solución fijadora y se mantuvo a 4°C por 24 hr.

PREPARACION DE LAMINILLAS

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

TINCION

Después de 24 hrs, las laminillas se sumergieron por 30 min en una solución de Hoechst 33258 (1 ug/ml) por una hora en ausencia de luz, se lavaron en agua destilada y se secaron. Posteriormente se colocaron en una solución McIlvane a pH 6.8 y se expusieron a luz ultravioleta y con una temperatura de 60°C durante 1.5 hr a una distancia de 10 cm. Finalizado este proceso las laminillas se lavaron con agua bidestilada y se tiñeron con Giemsa pH 6.8 por 3 minutos.

ANALISIS DE LAMINILLAS

Las laminillas previamente teñidas estuvieron listas para evaluar:

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

$$I.M. = \frac{\text{NUMERO TOTAL DE METAFASES}}{\text{NUMERO TOTAL DE NUCLEOS}}$$

Cinética de proliferación celular (C.P.C.): La C.P.C. fue evaluada en las primeras 100 metafases observadas, determinando el número de células en primera división (M1), segunda división (M2) y tercera división (M3). Se consideraron metafases en primera división aquellas cuyos cromosomas se encontraron teñidos completamente de oscuro, segunda división a los cromosomas que estaban conformados por una cromátida oscura y una clara y tercera división a las metafases que se caracterizan por presentar cromosomas teñidos completamente claros. Un indicador de la C.P.C. es el Índice Proliferativo (IP) que se calculó de la siguiente forma:

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

Otro indicador que se calculó dentro de la C.P.C. fue el Tiempo Promedio de Generación (T.P.G.) que se determinó de la siguiente manera:

$$T.P.G. = \text{Horas de exposición a la BrdU} / IP$$

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

Estas fueron determinadas en 50 metafases en segunda división de cultivos de 72 hr. En éstas se determinaron intercambios terminales e intersticiales, éstos últimos con un valor del doble de los primeros debido a que su formación requiere el doble de eventos que los terminales.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Básicamente se realizaron cuatro experimentos independientes, que consistieron en lo siguiente:

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

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

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

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

Para cada uno de los tratamientos se realizaron tres cultivos, y se compararon con un testigo negativo T(-), y un testigo positivo T(+), Mitomicina-C (10^{-7} M), éste sirvió como control, ya que se sabe que esta sustancia actúa como un depresor de la división celular. Esto también se llevó a cabo por triplicado, es decir en cada experimento se procesaron un total de nueve cultivos.

PREPARACION DEL TESTIGO POSITIVO CON MITOMICINA C

Con objeto de tener una referencia sobre los efectos mutagénicos y un control interno en los experimentos, se realizó un testigo positivo el cual consistió en agregar 50 μ l de Mitomicina-C (a una concentración final de 1×10^{-7} M) en cultivos de linfocitos de sangre venosa total a las 48 horas, para después continuar el proceso en la forma antes mencionada.

EXPOSICION DE LINFOCITOS A CEM DE 60 Hz DE FRECUENCIA

Durante el cultivo de los linfocitos humanos, éstos fueron colocados en el interior de un solenoide o bobina generadora del CEM, el cual estaba formado por un devanado de 340 vueltas de alambre de cobre calibre No.16 enrollado alrededor de un tubo de PVC, el cual tiene una altura de 25 cm, un radio de 5.27 cm y una resistencia de salida de 1.9 ohms. El solenoide está conectado a un transformador-reductor, con una alimentación de entrada de $127\text{ V} \pm 10\%$ con una salida de 12 V, éste a su vez estaba unido a un transformador variable que tiene un máximo de 140 V y 7.5 Amp de salida con una alimentación de 120 V y una frecuencia de 60 Hz. Este sistema de exposición se colocó en el interior de una incubadora que tuvo una temperatura constante de $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. En el presente estudio se utilizaron tres intensidades magnéticas (1.0, 1.5 y 2.0 μT) de onda sinusoidal de 60 Hz de frecuencia, esto fue constatado monitoreando el sistema con un osciloscopio. En el mismo sistema de incubación de los cultivos y en forma simultánea, se colocaron el testigo negativo y el control positivo en una área en la cual no recibieron la influencia del CEM. En la figura 3 se muestra una vista frontal de este sistema de exposición. Por otro lado, en la figura 4 se presenta un diagrama que ilustra la forma en que fueron colocados los cultivos a exponerse al CEM y la de los grupos no expuestos, en donde se puede apreciar las relaciones de distancia entre ellos. Cabe mencionar que se consideró la geometría de la exposición y para ello los cultivos expuestos fueron colocados sobre una base de acrílico que tenía círculos concéntricos marcados para cuidar así que la distancia del cultivo del centro a la periferia del solenoide fuera la misma, ya que se sabe que el campo eléctrico inducido por el CEM es dependiente del radio en el cual se encuentra la muestra.

La medición del CEM se realizó mediante la utilización de una bobina de prueba que al ser sometida a la influencia del campo detecta un voltaje (FEM inducida) que es proporcional a la intensidad de flujo magnético medido en Teslas. La bobina de prueba fue a su vez calibrada usando un gausímetro con una referencia de 10.1 Gauss (1.01 mT) es igual a 1.7 mV de corriente alterna detectados por la bobina de prueba. El voltaje (FEM inducida) fue de 1.08, 2.52 y 3.36 mV para 1.0, 1.5 y 2.0 mT respectivamente. Se constató asimismo con la bobina de prueba que el CEM era homogéneo dentro del solenoide donde se expusieron los cultivos de linfocitos.

En la figura 5 se observa un diagrama general de todos los componentes del sistema de exposición mencionados anteriormente y la manera en que fueron dispuestos, asimismo, en la figura 6 se aprecia el correspondiente diagrama eléctrico de este sistema de exposición de linfocitos humanos *in vitro* a CEM.

ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas. Posterior a la determinación de las estadísticas descriptivas correspondientes, las diferentes variables fueron sometidas a la prueba Kolmogorov-Smirnov con objeto de conocer la distribución de cada una. Aquellas con distribución normal, que para el caso de este estudio solo la variable ICH tuvo esta distribución, se aplicó un Análisis de Varianza y la correspondiente prueba de Tukey para saber comparar diferencias individuales entre los tratamientos aplicados.

Para el caso de las otras tres variables analizadas; Índice Mitótico, Índice Proliferativo y Tiempo Promedio de Generación, cuya distribución no fué normal, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y la correspondiente U de Mann-Whitney para observar las diferencias individuales en caso de haber significancia en la primera prueba aplicada.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización del paquete estadístico SPSS (Ferran, 1996).

RESULTADOS

En la figura 7 se muestran metafases con la técnica de ICH en linfocitos humanos periféricos tratados con CEM oscilantes de 60 Hz así como el testigo positivo tratado con Mitomicina-C y el testigo negativo, asimismo se muestra el tratamiento combinado de Mitomicina-C (10^{-7} M) y 2.0 mT de CEM. De la tabla I a la IV se presentan los datos totales del análisis de 50 metafases en cuanto a la frecuencia de ICH, con tres repeticiones, para cada uno de los tratamientos (1.0, 1.5, 2.0 mT y 2.0 mT + MMC respectivamente) para cada tratamiento se incluyó un testigo positivo y otro negativo. Se observa en ellas la media y su respectiva desviación estandar en cada uno de los casos.

En la figura 8, se presentan graficamente los resultados de la frecuencia de ICH comparados con sus testigos para cada uno de los tratamientos. El análisis de varianza reveló que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el testigo negativo y el tratamiento con campo magnético a las tres intensidades usadas. Asimismo se constató que no existe un efecto sinérgico de la Mitomicina-C y el tratamiento con 2.0 mT de CEM. Como era de esperarse, el testigo positivo que contenía Mitomicina C, mostró una frecuencia significativamente mayor que el testigo negativo ($p < 0.05$).

Por otro lado, se estimó el efecto de los CEM sobre la división celular ; de la Tabla V a la VIII se presentan los valores del Índice Mitótico obtenidos para los diferentes tratamientos y sus respectivos testigos. En la figura nueve se muestran graficamente estos resultados. Analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y posteriormente por parejas con la U de Mann-Withney, se determinó que el CEM, en todas sus intensidades incrementó significativamente la división de los linfocitos ($p < 0.05$). Asimismo se observó un efecto antagónico del campo magnético y la MitomicinaC, ya que en el tratamiento que combina los dos factores se presentó un incremento del Índice Mitótico cuando se expuso a 2.0 mT de CEM mas Mitomicina-C 10^{-7} M con respecto a un cultivo tratado solamente con la Mitomicina($p < 0.05$).

Análisis de la Cinética de Proliferación Celular

Mediante el recuento de metafases en primera, segunda y tercera división que se observaron mediante la técnica de ICH (Figura numero 10) se determinó el Índice Proliferativo y el Tiempo Promedio de Generación. En las tablas IX a la XII se presentan los datos totales de los Índices Proliferativos para cada uno de los tratamientos y repeticiones realizadas. Por su parte la figura 11 muestra resultados gráficamente en donde se observa que en las tres intensidades magnéticas se presentó un incremento en el Índice Proliferativo con respecto al Testigo negativo. El análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis y

posteriormente por parejas con la U de Mann-Withney reveló una diferencia significativa ($p < 0.05$). Asimismo se observó, como era de esperarse una baja en la división celular en el testigo positivo. En el caso del tratamiento combinado de 2.0 mT de CEM más Mitomicina-C se observó que aunque la proliferación celular disminuye con respecto al testigo negativo, esta disminución fue menor que la observada en el testigo positivo, tratado únicamente con MitomicinaC, lo que sugiere un efecto antagónico del CEM con respecto al mutágeno químico

Este mismo efecto se pudo observar cuando la variable considerada fue el Tiempo Promedio de Generación (TPG) ya que este es inversamente proporcional al Índice Proliferativo. En las Tablas XIII a la XVI se muestran los datos totales del TPG para los diferentes tratamientos. Por su parte la figura número 12 presenta gráficamente estos resultados. El análisis estadístico reveló como en el Índice Proliferativo presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$)

DISCUSION

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

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

En lo que concierne al tratamiento combinado CEM más Mitomicina-C, no se encontró efecto sinérgico aparente, nuestros hallazgos concuerdan con los informados por Zwingelberg y Cols. (1993), ellos utilizaron un tratamiento combinado de ciclofosfamida y CEM y no encontraron efecto sinérgico al exponer linfocitos a dichos agentes. Sin embargo Rosenthal y Obe (1989) probaron la acción combinada de agentes químicos mutagénicos con CEM y detectaron sinergismo.

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

Sin embargo, como pudo observarse en los resultados del presente estudio se observaron cambios significativos en lo que respecta a la proliferación de linfocitos expuestos a los CEM, manifestándose como un incremento en el Índice Mitótico así como en el Índice Proliferativo en todas las intensidades aquí probadas. Estos resultados son similares a aquellos obtenidos por Antonopolus y

Cols (1995) quienes al exponer cultivos de linfocitos a 5.0 mT de CEM de 50 Hz informan incrementada la división celular.

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

Nuestro estudio no concuerda con lo encontrado por Khalil y Cols (1991) donde informan una disminución en la actividad mitótica de linfocitos expuestos a una intensidad muy parecida a la nuestra, ellos usaron 1.05 mT, sin embargo cabe mencionar que los CEM empleados eran pulsantes.

En los resultados obtenidos con el tratamiento combinado de Mitomicina-C y CEM de 2.0 mT se pudo observar un efecto antagónico aunque la disminución en la cinética de proliferación celular no fué tan marcada como en los cultivos que solo fueron tratados con Mitomicina-C y que en este estudio se utilizó como testigo positivo.

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

CONCLUSIONES

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

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

c) Se observó un efecto antagónico de los campos electromagnéticos con respecto a la MitomicinaC.

Con los resultados encontrados en este trabajo se puede aseverar que bajo las condiciones experimentales aquí utilizadas, los campos electromagnéticos sí son capaces de modificar actividades celulares, como en este caso, la división celular. No se pudo demostrar un efecto genotóxico, sin embargo sería conveniente la utilización de otros procedimientos citogenéticos, como por ejemplo el análisis de aberraciones cromosómicas o de los sitios frágiles que aumentarían la sensibilidad del estudio. Otra posibilidad de incrementar la confiabilidad de los resultados, sería el aumentar el tamaño muestral y contar así con linfocitos humanos de varios donadores. Asimismo, se recomienda un estudio *in vivo* en donde los mecanismos de reparación propios de la célula pudiesen revertir el efecto provocado por estas radiaciones de extremadamente baja frecuencia.,

LITERATURA CITADA

- Alhadeef B. and Cohen M.M. - 1976 - Frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes - *Isr. J. med Sci.* - 12:1440-1447.
- Andrew C. and Basset L. - 1985 - Aspectos Prácticos y Fundamentos de Usos Terapeuticos de Campos Electromagneticos Pulsados - *Rev. de Ingeniería Biomedica*, 5:451-529.
- Antonopoulos A., Yang BC., Estamm A., Heller WD., Obe G. - 1995 - Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro - *Mutation Research Letters* - 346:3 pp 157-157.
- Armendares S.S. -1968 - *Citogenetica Humana y Patologica* - Editorial Interamericana - Primera Edicion - pp 53-54.
- Bauchinger M., Hauf R. , Schmid E. and Dresp J. - 1981 - Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380 kV-systems - *Radiat Environ. Biophys* - 19, 235-238.
- Bersani F. , Franceschi C. , Monti D. , Bologni A. , Gatti C. , Cadossi.R. Nichelatti M. , Moschini G. and Cossarizza A. - 1988 - The effects of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields (ELF) on human lymphocyte proliferation in vitro and DNA repair - *Engineering in medicine and biology society 10th annual international conference* - CH2566-8/88/0000--0906 .
- Blank M. - 1995 - Biological effects of enviromental electromagnetics fields : Molecular mechanism - *Biosystems* - 35:175-178.
- Bowman J.D., Thomas D.C., London S.J., Peters J.M. - 1995 - Hipotesis : The risk of childhood leukemia is related to combinations of power-frecuency and statics magnetic fields -*Bioelectromagnetics* 16(1): 48-59.
- Brandt L. - 1985 - Enviromental factors and leukemia - *Med. oncol and tumor pharmacother.* 2(1) 7-10 .
- Brusik D. - 1987 - *Principles of genetic toxicology* - New York - Plenum Press - pp 53-76 .

- Cantini M., Cossarizza A., Bersani F., Cadossi R., Cecherelli G., Tenconi R., Gatt C., and Franceschi C. - 1986 - Enhancing effects of pulsed electromagnetic fields on lectin-induced human lymphocyte proliferation - *J. Bioelectric* - 5:91-104 .
- Carrano A.V. , Minkler J.L. , Stetka D.G. and Moore D.H. -1980 - Variation in the baseline sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes - *Environ. Mutagen.* - 2:325-337 .
- Chaganti R.S., Schonberg S. and German J. - 1974 - A many fold increase in sisterchromatid exchange in Bloom's syndrome lymphocyte - *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 71:4508-4512 .
- Cohen M.M. , Kunska A. Astemborski J.A. and McCulloch D. - 1986 - The effect of low -level 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells - *Mutation Research* , 172:177-184 .
- Coleman M., Bell J. and Skeet R. - 1983 - Leukemia incidence in electrical workers - *Lancet* - 982-983.
- 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 aged subjects - *Biochemical and biophysical research comunications* - 160(2): 692-698 .
- Costa J.L. and Hoffmann G.A. - 1987 - Malignicy treatment - US Patent No.65898.
- Craig-Holmes A.P. and Shaw M. - 1977 - Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in culture human lymphocytes - *Mutation Res.* 46:375-384 .
- Crossen P.E., Drets M.E. Arrighi F.E. and Johnston D.A. - 1977 - Analysis of the frequency and distribution of sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes - *Hum. Genet.* - 35:345-352 .
- Crossen P.E. and Morgan W.F. - 1977 - Analysis of human limphocyte cell cycle time in culture measure by sister chromatid differential staining - *Exp. Cell Res.*, - 104:375-384 .
- D'Ambrosio G., Scaglione A., Beradino D.D., Lioi M.B., Iannuzzi L., Mostacciuolo E. and Scarfi M.R. - 1985 - Chromosomal aberrations induced by ELF electric fields - *J. Bioelectric* - 4, 279-284 .

- Elizondo Azuela G. - 1993 - Evaluacion del daño genotóxico en linfocitos de sangre periferica de individuos tratados con metronidazol - Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del I.P.N. - Tesis inedita - pp 9-21 .
- Emery A.E. - 1981 - Genética Médica - Editorial Interamericana - Cuarta edicion pp 44-45.
- Fenech, M. y Morley, A.A. - 1985 - Measurent of micronuclei in human lymphocytes - Mutat. Res. - 149: 29-36 .
- Ferran, A.M.-1996 - SPSS para Windows - Editorial Mc Graw-Hill - Primera edición - pp 560
- Fitzgerald K. - 1990 - Electromagnetic fields : the jury's still out - IEEE Spectrum - August - 800:22-35.
- Galar Castelan I. - 1988 - Electricidad y magnetismo - Editorial LIMUSA - Primera edicion pp 222-230 .
- Galloway S.M. - 1977 - Ataxia telangiectasia : the effects of chemical mutagens and X rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes - Mutat. Rese. - 45:343-349 .
- Galt S., Wahistrom J., Hamnerius Y., Holmqvist D. and Johannesson - 1995 - Study of effects of 50 Hz magnetic fields on chromosome aberrations and growth-related enzyme ODC in human amniotic cells - Bioelectrochemistry and Bioenergetics - 36:1 pp 1-9.
- Garcia-Sagredo J.M., Parada L.A. and Monteagudo J.L. - 1990 - Effect on SCE in human chromosomes in vitro of low-level pulsed magnetic field - Enviromental and molecular mutagenesis - 16:185-188 .
- Goodman R., Bassett C.A.L. and Henderson A.S. - 1983 - Pulsing electromagnetic Fields induce cellular transcription - Science - 220:1283-1285 .
- Gonzalez Ramos M. - 1985 - Texto de Citogenetica Clinica - Ed. Salvat - Primera edicion - pp 249-259 .
- Grinstein, S. and Dixon, S.J. -1989 - Ion Transport, membrane potential and cytoplasmic phin Lymphocytes : Changes during activation - Physiol Review - 69 :417-481
- Guizar Vazquez J.J. - 1988 - Genética Clínica - Ed. El Manual Moderno - Primera Edicion - pp 80-84.

- Khalil A.M. and Qassem W. - 1991- Cytogenetic effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro : Chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and cell kinetics - Mutation Research - 247:141-146.
- Koana T., Ikehata M., Nakagawa M. - 1995 - Estimation of genetic effects of a static magnetic field by a somatic cell test using mutagen-sensitive mutants of *Drosophila melanogaster* - Bioelectrochemistry and Bioenergetics - 36:2 pp 95-100 .
- Kowalczyk C.I. and R.D. Saunders - 1990 - Dominant lethal studies in male mice after to exposure to a 50 Hz electric field - Bioelectromagnetics - 11:129-137 .
- Kowalczyk C.I., Robbins L., Thomas J.M., Saunders R.D. - 1996 - Dominant lethal studies in male mice after exposure to 50 Hz magnetic field - Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis - 328: 2 pp 229-237 .
- Lambert B. Hansson K., Lindsten J. , Sten M. and Werelius B. - 1976 - Bromodeoxyuridine-induced sister-chromatid exchanges in human lymphocytes -Hereditas - 82:163-174 .
- Latt S.A. - 1973 - Microfluorometric detection of deoxiribonucleic acid replication in human metaphase chromosome - Proc. Natl. Acad. Sci (USA) - 70:3395-3399.
- Latt S.A. - 1981 - Sister-chromatid exchange formation - Rev. Genetic. - 15:11-55 .
- Liboff A.R., Williams T., Strong D.M., and Wistar R. - 1984 - Time-varying magnetic fields: effects on DNA synthesis - Science - 223 818-820 .
- Liburdy R.P. - 1992 - Calcium signaling in Lymphocytes and ELF Fields, evidence for an electric field metric and asite of interaction involving the calcium ion channel - Fed of Europ. Biochem Societies - 30 (1) :53-59
- Lichtman A.H., Segel G.B. and Lichtman M.A. - 1983 - The role of calcium in Lymphocyte proliferation (an interpretative review) Blood - 61 : 413-422
- Lin J.C.- 1994 - Advances in electromagnetic fields in living systems - Plenum press ,New York - pp 16,17,130,149 .
- Lisker R. y Armendares S. - 1994 - Introducción a la Genética Humana - Editorial El Manual Moderno - Primera edicion - pp 16-18.

- Loescher W., Mevissen M., Lehmacher W., and Stamm A. - 1993 - Tumor promotion in a breast cancer model by exposure to a weak alternating magnetic field -Cancer letters 71:75-81 .
- McDowall M.E. - 1983 - Leukemia mortality in electrical workers in England and Wales - Lancet - p 243 .
- McLeod K., Lee R. and Erlich - 1987 - Frequency dependence of electric fields modulation of fibroblast protein synthesis - Science - 236:1465-1469.
- Metcal F.J.C., Moore J.P., Smith G.A. and Hesketh T.R. - 1986 - Calcium and cell proliferation - Brithis Med . Bull. - 42 : 405-412
- Milham S. - 1982 - Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields - New Engl. J. Med. - p 307,249.
- Moreno-Trujillo O.A. - 1997 - Diseño de un equipo de Tesla modulado en baja frecuencia para el tratamientop experimental de la osteoporosis aplicable al laboratorio de fisiología de la escuela médico militar - Universidad del ejercito y fuerza aerea escuela militar de ingenieros - Tesis inedita – pp 33-45 .
- Morhead P.S. - 1960 - Chromosome preparation of leukocytes from human peripheral blood - Cell Res. - 20: 613-618.
- Muñoz R. - 1994 - estudios juridicos sobre la regulacion y reglamentacion que existe en materia de riesgos , derivados de problemas que se producen en los campos electromagneticos y sobre el reconocimiento en la legislacion del peligro potencial de daño que existe en instalaciones electricas de alto voltaje - Comision Federal de Electricidad - pp 1-10 .
- Mutchinick O., Ruz L., Gonsebatt M.E., Mauleon P., Lisker R. y Garcia G. - 1981 - Frequency and types of induced spointaneous chromosome aberrations in relation to cell kinetic - Human Genet. - 59:137-140.
- Nie N.H., Hull C.H., Jenkins J.G., Steinbrenner K. and Bent D.H. - 1970 - Statistical package for the social sciences (SPSS) - Mc Graw Hill Book - Second edition - pp 293-300 .
- Nora A. H. and Fraser F.C. - 1974 - Genética Médica - La Prensa Americana - Primera Edicion - pp 18-24 .
- Nordenson I. , Mild K.H. , Anderson G. and Sandstrom M. -1994 - Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermitent exposure to fifty hertz magnetic fields - Bioelectromagnetics - 15(4):293-301 .

- Nordstrom S., Birke E. and Gustavsson L. - 1983 - Reproductive hazards among workers at high voltage substations - Bioelectromagnetics - 4, 91-101 .
- Parker, S.P. - 1993 - Encyclopedia of Physics - Second edition - McGraw-Hill pp 337-339 .
- Pearce N.E., Sheppard R.A., Howard J.K., Fraser J. and Lilley B.M. - 1985 - Leukemia in electrical workers in New Zeland - Lancet - p 811-812.
- Perry , P. y Evans , H.J. - 1975 - Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange - Nature - 258: 121-125 .
- Perry T.S. - 1993 - Today's view of magnetic fields - IEEE SPECTRUM - December 14-23.
- Pothakamury U.R., Barletta B.J., Barbosa G.V. y Swanson B.G. - 1993 - Inactivación de microorganismos en alimentos usando campos magnéticos oscilantes - Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos 33(5) pp 479-489.
- Raposa T. - 1978 - SCE studies for monitoring DNA damage and repair capacity after citostatic *in vitro* and *in vivo* lymphocyte of leukaemia patients under cytostatic therapy - Mutation Res. - 53:241-251.
- Rodan G.A., Bourret L.A. and Norton L.A. - 1978 - DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields - Science - 199:690-692.
- Rojas E., Montero R., Herrera L.A. , Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodriguez R. y Ostrosky-Wegman P. - 1992 - Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? - Mutation Res. -282:283-286.
- Royo A. - 1981 - Física de campos y ondas - Primera edición - Editorial Fondo Educativo Moderno Interamericano - pp 132 - 145 .
- Rosenthal M. and Obe G. - 1989 - Effects of 50 Hertz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens - Mutation Research - 210:329-325 .
- Salamanca F. - 1990 - Citogenética Humana - Primera edición - Editorial Panamericana - pp 27-30, 58-60 .

- Scarff M.R. and Franceschetti - 1991 - Micronuclei formation in human lymphocytes exposed to 50 Hz AC electric fields - *Electromagnetics in biology and medicine* - 27:159-162.
- Schneider L.E., Stenberg H., Tice R.R., Senula G.C., Kram D., Smith J. and Bynum G. - 1979 - Cellular replication and aging. Mechanisms of ageing and development - 9: 313-324 .
- Steka D., y Wolff S. - 1976 - SCE as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. II *In vitro* test for compounds requiring metabolic activation - *Mutation Res.* 41:343-350 .
- Snope A.K. and Rary J. - 1979 - Chromosome number 11 and Wilm's tumor - *Cancer Genet. Cytogenet.* - 5:237-245 .
- Speers M.A., Dobbins J.D. and Miller V.S. - 1985 - Occupational exposures and brain cancer mortality : a preliminary study of east Texas (USA) residents - *Am. J. Ind. Med.*, 13:629-638.
- Stewart J.R. - 1979 - The electrostatic and electromagnetic effects of A.C. transmission Lines - *IEEE* pp 4-10 .
- Strother G.K. - 1980 - *Fisica - aplicada a las ciencias de la salud* - Mc Graw Hill p 312 .
- Summer , A.T., Evans, H.J. and Buchland R. - 1971 - A new technique for distinguishing between human chromosomes - *Nature New Biol.* - 231:31 .
- Sutherland G.R., Baker E., Saeshadri R.S. and Black A. - 1980 - Increased sister chromatid exchange in multiple sclerosis - *New Eng. J. Med.* - 303:1126-1129 .
- Synder C.A. y Valle C. - 1991 - Lymphocyte proliferation assays as potential biomarkers for toxicant exposures - *J. toxicol. Environ. Health*, 34, 127-139 .
- Tabrah F.L. , Mower H.F., Batkin S. and Greenwood P.B. - 1994 - Enhanced Mutagenic Effect of a 60 Hz time-varying magnetic field on numbers of azide-induced TA100 revertant colonies - *Journal of Bioelectromagnetics* 15:85-93.
- Takahashi K., Kaneko I., Date M. and Fukada E. - 1987 - Influence of pulsing electromagnetic field on the frequency of sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells - *Experimentia* - 43:331-332.
- Taylor D.L. and Albertini R.J. - 1957 - Confidence intervals and sample size calculations to compare variant frequencies - *Environ. Mutagen* .

- Tenforde T.S. - 1991 - ELF field interactions at the animal , tissue, and cellular levels - *Electromagnetics in biology and medicine* - 39: 225-245.
- Thompson J.S. y Thompson M.W. - 1968 - *Genetica Medica* - Editorial Salvat - Primera Edicion - pp 6-11.
- Tofani S., Ferrara A., Anglesio L., Gilli G.- 1995 - Evidence for genotoxic effects of resonant ELF magnetic fields - *Bioelectrochemistry and Bioelectromagnetics* - 36:1 pp 9-13.
- Tomenius L., Hellstroem L. and Enander B. - 1982 - Electrical constructions and 50 Hz magnetic field at the dwelling of tumor cases (0-18 years of ages) in the county of Stockholm - *Proceedings of the International Symposium on Occupational Health and Safety in Mining and Tunneling ,Prague .*
- Valijus J., Norppa H., Jarventaus H., Sorsa M., Nykyri E. Salomaa S., Jarvinen P., Kajander J. - 1993 - Analysis of chromosomal aberrations , sister chromatid exchanges and micronuclei among power linesmen with long-term exposure to 50 Hz electromagnetic fields - *Journal-Radiat- Environ-Biophys.* - 32(4): 325-336 .
- Wertheimer N. and Leper E. - 1979 - Electrical wiring configurations and childhood cancer - *Am. J. Epidemiol.* - 109:273-284.
- Wright W., Peters J.M. and Mack T.M. - 1982 - Leukemia in workers exposed to electrical and magnetic fields - *Lancet* - pp 1160-1161 .
- Wood R. - 1991 - *Magnetismo : de la brujula a los imanes superconductores* - primera edicion - McGraw-Hill - pp 1-33 .
- Wolff S. - 1977 - Sister chromatid exchange - *Ann. Rev. Genet.* - 11:183-201.
- Wolff S., Bodycote J. and Painetr R.B. - 1974 - Sister Cromatid exchanges induce in Chinese hamster cell by U.V. radiation of different stages of the cell cycle : the necessity for cell to pass through S - *Mutation Res.* - 25:73-81.
- Yen-Patton G.P.A., Patton W.F., Beer D.H. and Jacobson B.S. - 1988 - Endothelial response to electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro - *J. Cell. Physiol.* - 134:37-46 .
- Zwingelberg R., Obe G., Mevissen M., Buntenkotter S., Loscher W.- 1993 - Exposure of rats to 50 Hz, 30 mT magnetic field influences neither the frecuencies of sister chromatid exchanges nor proliferation characteristics of cultured peripheral lymphocytes - *Journal Mutat. Res.* 302(1) :39-44.

APENDICE I

EQUIPO

- Microscopio Zeiss , West Germany Serie 1333-0.
- Centrifuga marca Clay Adams modelo Dynac II serie 251086.
- Transformador reductor marca IVSA modelo 816-250 12 V, 3 Amp.
- Transformador variable marca VARIAC STACO, modelo 500B Serie Poop 2446.
- Solenoide de 340 vueltas de alambre magneto #16.
- Incubadora (Marca Ortiz , serie 4774-40M126).
- Multimetro digital (Marca Otto DT-3900 , serie 19867050).
- Osciloscopio de 2 canales (Marca BK , modelo 2120 , serie 201-01787)

APENDICE II

CRISTALERIA Y VARIOS

- Tubos cónicos Pyrex de 15 mL
- Pipetas Pasteur
- Bulbos para pipeta
- Portaobjetos y cubreobjetos Corning
- Agitadores magnéticos SIGMA
- Vasos de precipitado Pyrex de 50,100,250 y 1000 ml .
- Probetas de 50 y 100 ml Pyrex
- Jeringas Plastipak de 1,3 y 5 ml
- Frascos de cultivo de 20 ml GIBCO

APENDICE III

PREPARACION DE SOLUCIONES

Colchicina

Solución madre :

0.4 g de Colchicina en 100 ml de solución salina 0.9%.

Solución de Trabajo :

1 ml de solución de trabajo en 100 ml de solución salina al 0.9% .

Mitomicina-C

Solución madre (400 µg / ml)

2 mg de Mitomicina-C en 5 ml de medio RPMI

Solución de trabajo (1 x 10⁻⁵ M)

1 ml de Mitomicina-C (Solución madre)

119.6 ml de medio RPMI

KCl 0.075M (Solucion hipótónica):

5.582 g de KCl se disuelven en 1000 ml de agua destilada.

Solución Fijadora (Carnoy) :

90 ml de etanol

30 ml ácido acético

Giemsa

solución madre :

264 ml de metanol

264 ml de glicerina

4 g de Giemsa (polvo)

Buffer de fosfatos A :

5.349 g de KH₂PO₄ en 1000 ml de agua bidestilada .

Buffer de fosfatos B:

3.402 g de Na₂HPO₄ en 1000 ml de agua bidestilada.

Giemsa

Solución de trabajo:

1 ml de solución madre de Giemsa
0.6 ml de Buffer A
0.6 ml de Buffer B
25 ml de agua bidestilada

Solución de BrdU

2 mg de BrdU
10 ml de H₂O bidestilada

Solución de Hoechst

1 mg de Hoechst 33258
10 ml de agua bidestilada .

Buffer Mc Ilvane (pH 6.8)

Buffer 1 de Fosfato de sodio dibasico 0.2 M
28.41 g Na₂HPO₄
1000 ml de H₂O bidestilada

Buffer 2 de Acido cítrico 0.1 M
21.01 g Ac. cítrico monohidratado
1000 ml de H₂O bidestilada

APENDICE IV

FIGURAS

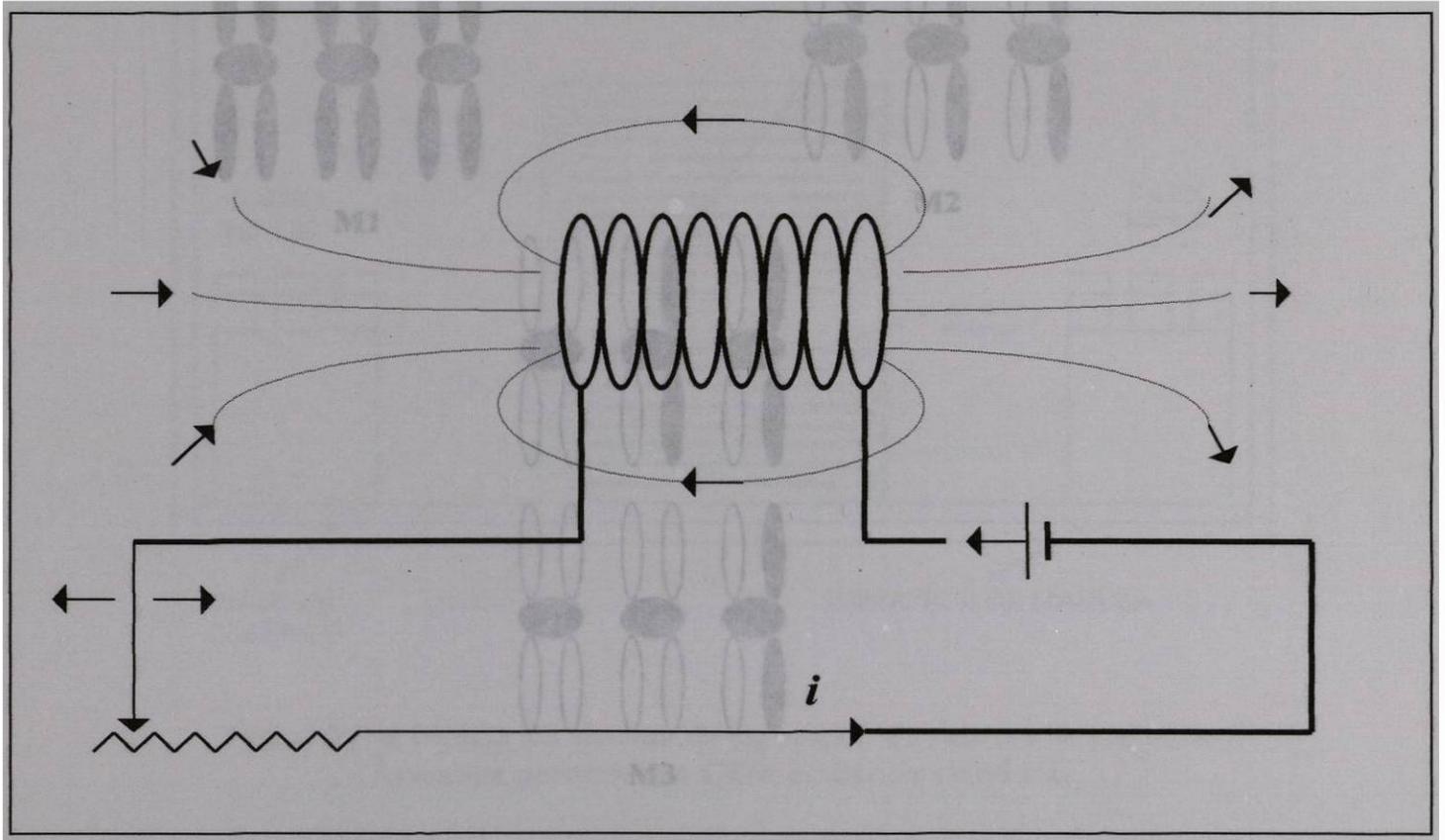


Figura 1. Diagrama de un solenoide de N espiras, las flechas representan las líneas del campo electromagnético inducido por la corriente que circula a través del alambre enrollado como espiras.

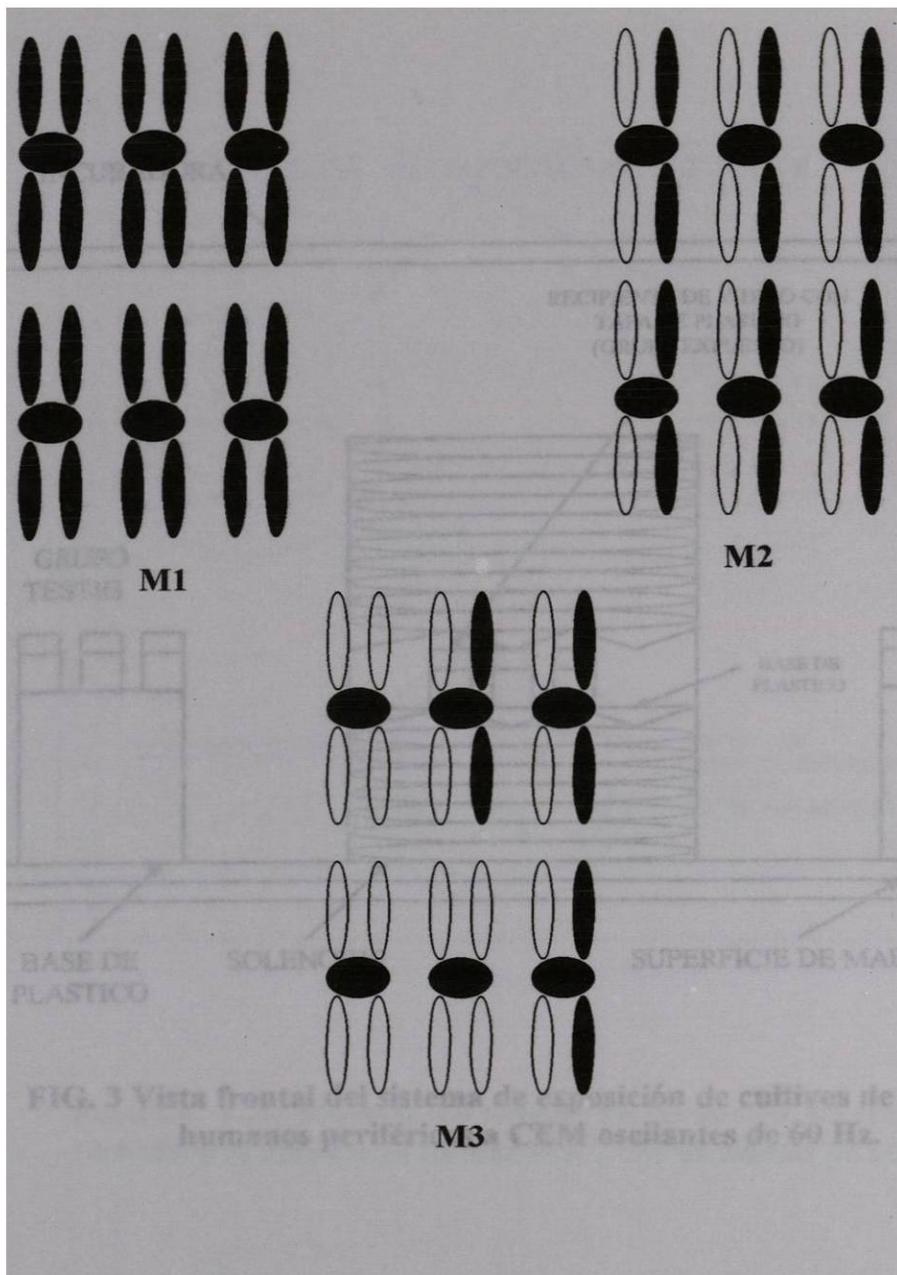


Figura 2. Esquema que muestra la tinción diferencial de las cromátidas que se obtiene mediante la técnica de fluorescencia más Giemsa. (M1), Metafases en primera división (M2) Metafases en segunda y (M3) en tercera.

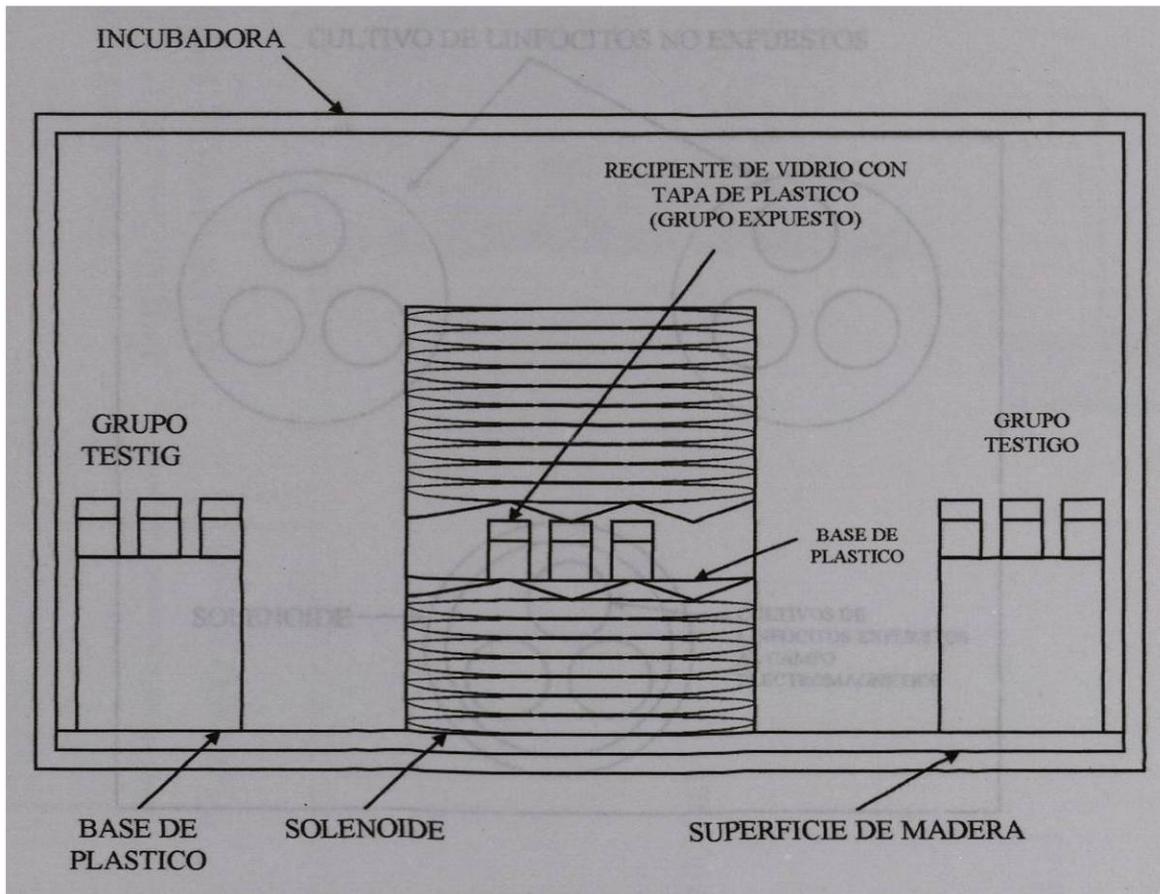


FIG. 3 Vista frontal del sistema de exposición de cultivos de linfocitos humanos periféricos a CEM oscilantes de 60 Hz.

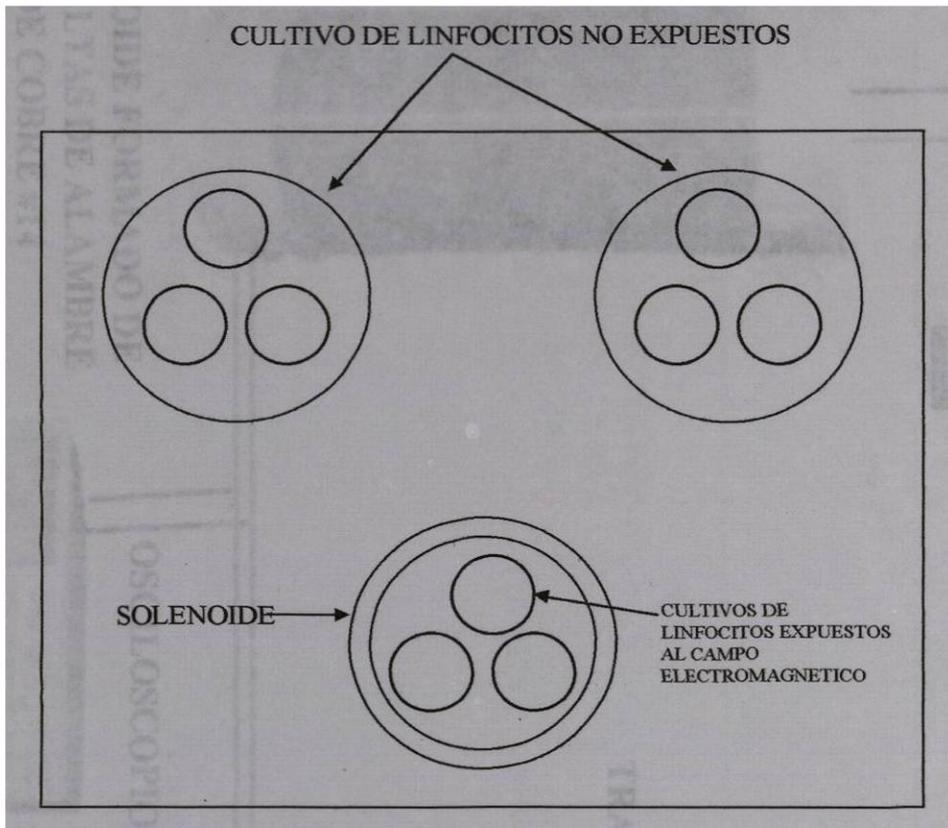


Figura 4. Vista superior del sistema de exposición de cultivos de linfocitos periféricos humanos a CEM oscilantes de 60 Hz.

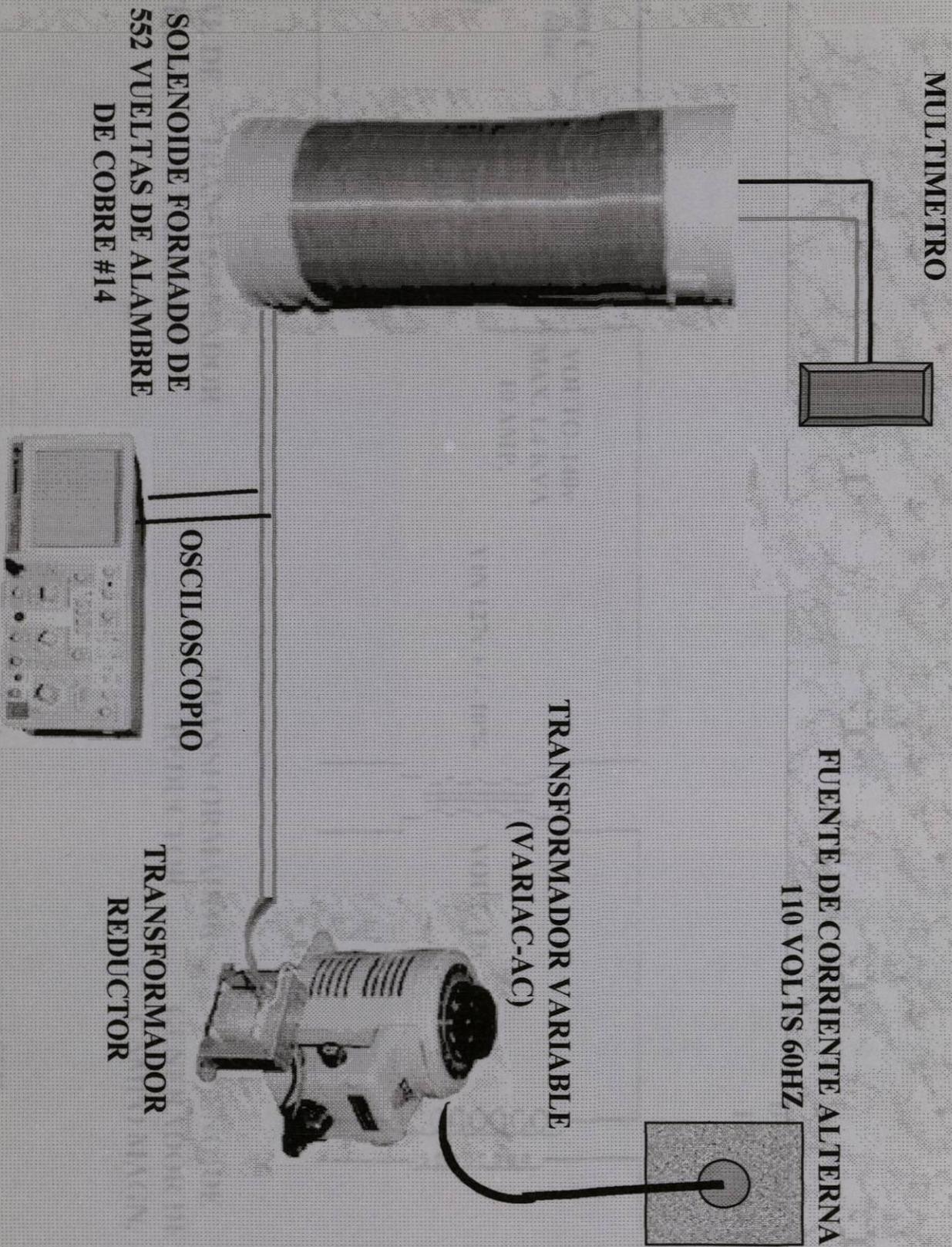
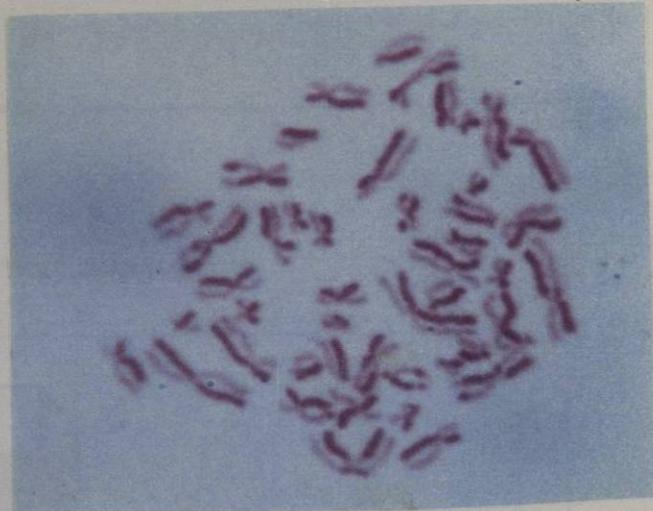


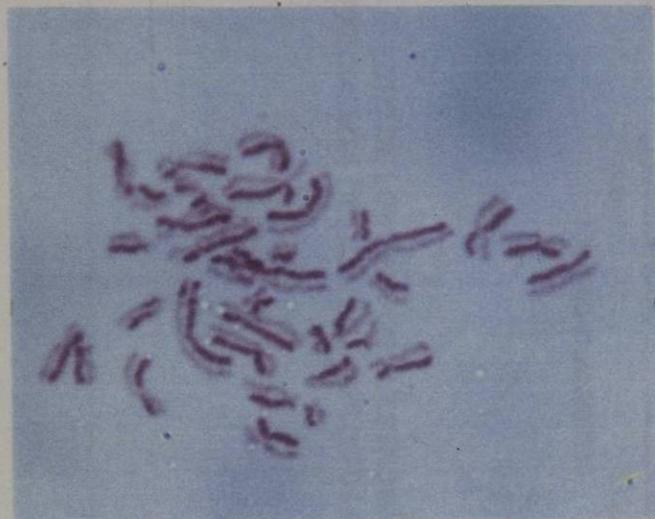
Figura 5.- Diagrama general del sistema de exposición utilizado para estimulación magnética de cultivos de linfocitos humanos periféricos con CEM oscilantes de 60 Hz.



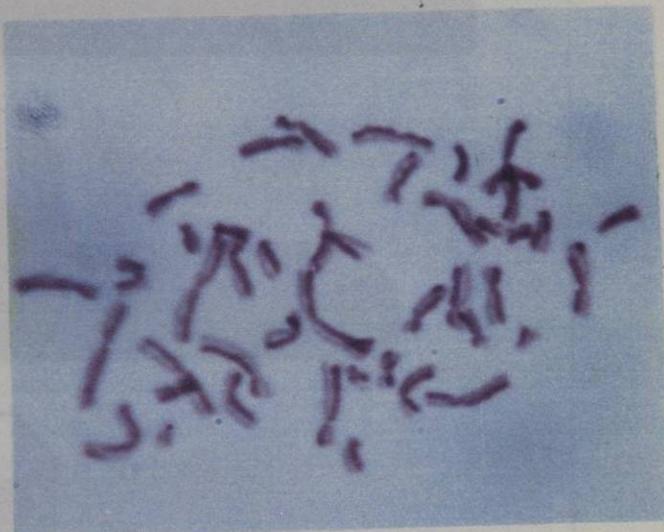
(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

FIGURA 7.- METAFASES QUE MUESTRAN EL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A DIFERENTES TRATAMIENTOS (100X). (A) ; TESTIGO NEGATIVO, (B); TESTIGO POSITIVO TRATADO CON MITOMICINA C, (C) ; 1.0 mT , (D); 1.5 mT, (E); 2.0 mT, (F); 2.0 mT + MITOMICINA C.

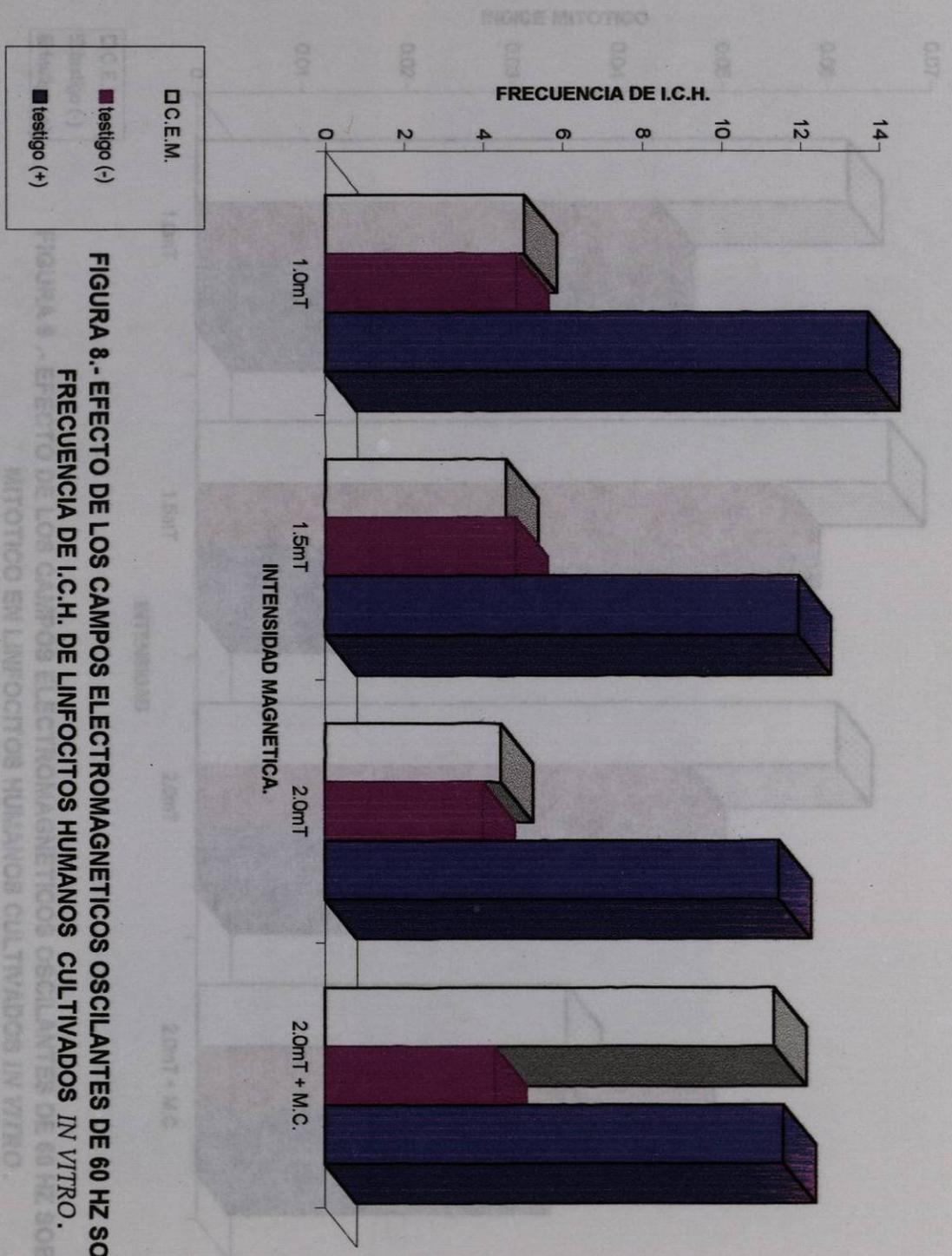


FIGURA 8.- EFECTO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE LA FRECUENCIA DE I.C.H. DE LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS IN VITRO.

MITOTICO EN LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS IN VITRO.

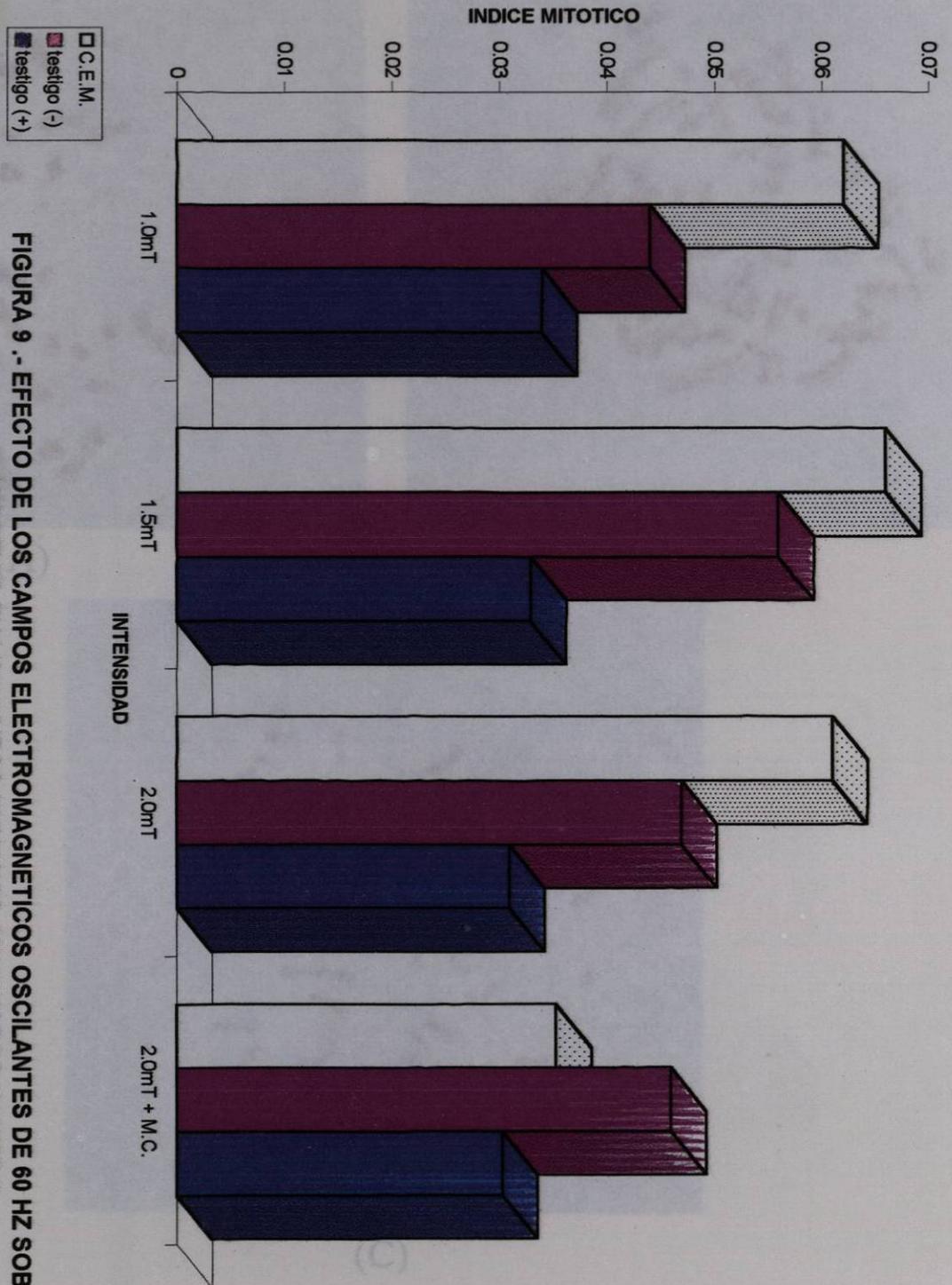
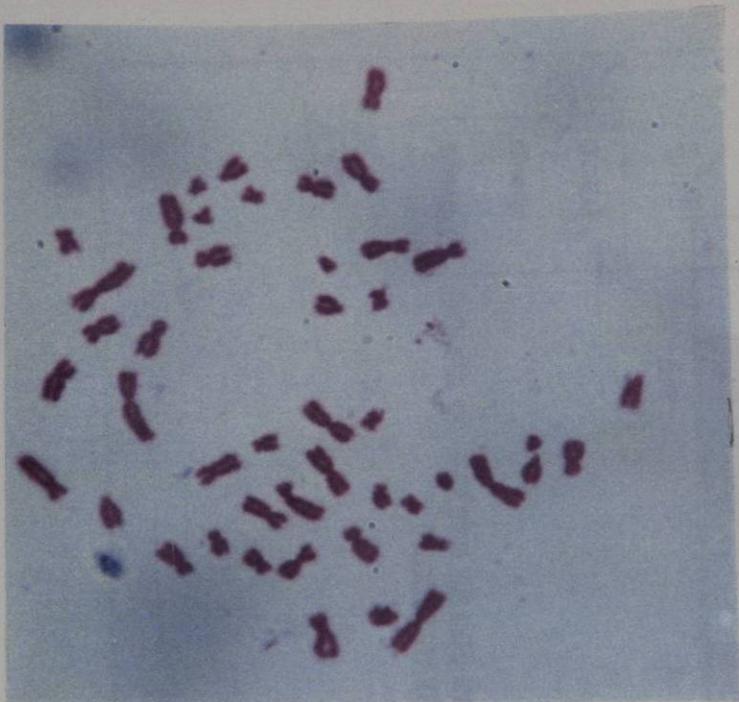


FIGURA 9 .- EFECTO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE EL INDICE MITOTICO EN LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS IN VITRO .

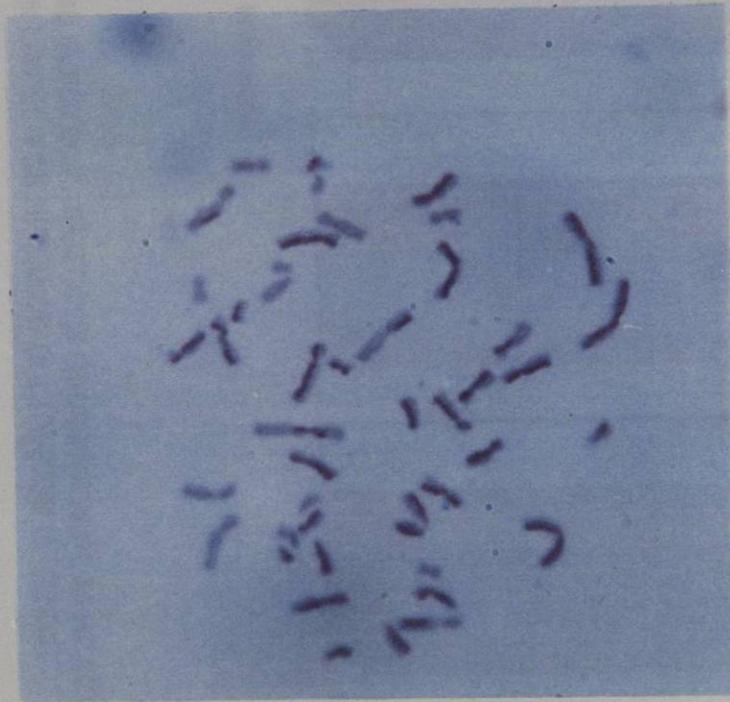
FIGURA 10 .- PANORAMICA QUE MUESTRA METAFASES DE LINFOCITOS HUMANOS TENIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS . (A) METAFASE EN PRIMERA DIVISION, (B) METAFASE EN SEGUNDA DIVISION, (C) TERCERA DIVISION.



(A)



(B)



(C)

FIGURA 10 .- PANORAMICA QUE MUESTRA METAFASES DE LINFOCITOS HUMANOS TEÑIDOS MEDIANTE LA TECNICA DE INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS . (A) METAFASE EN PRIMERA DIVISION, (B) METAFASE EN SEGUNDA DIVISION, (C) TERCERA DIVISION. (100X).

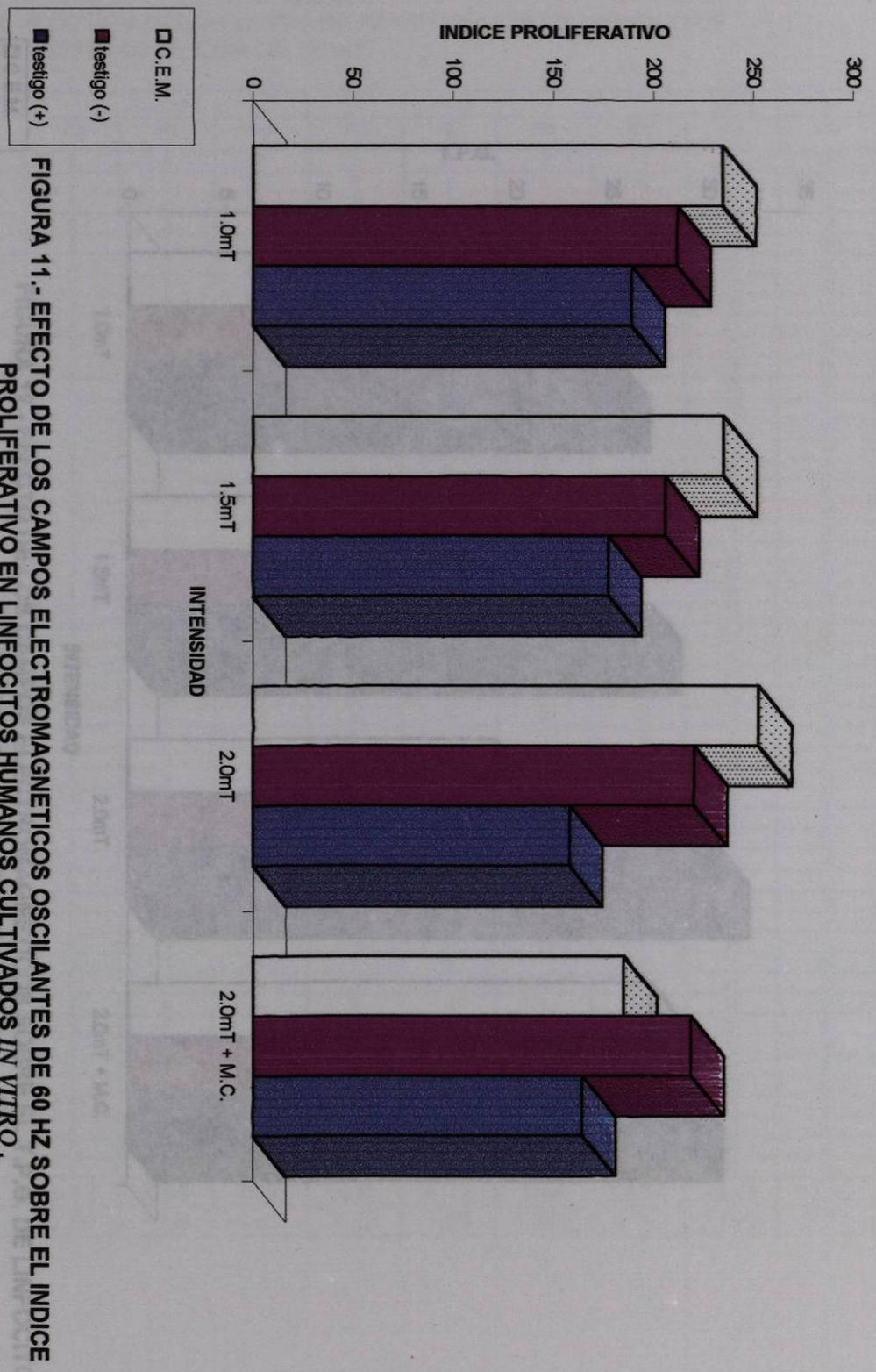


FIGURA 11.- EFECTO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS OSCILANTES DE 60 HZ SOBRE EL INDICE PROLIFERATIVO EN LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS IN VITRO.

APENDICE V
TABLAS

TABLA I.- FRECUENCIA DE ICH DEL ANALISIS DE 50 METAFASES DE LINFOCITOS TRATADOS CON UNA INTENSIDAD DE CEM DE 1.0 mT.

□ C.E.M.
■ testigo (-)
■ testigo (+)

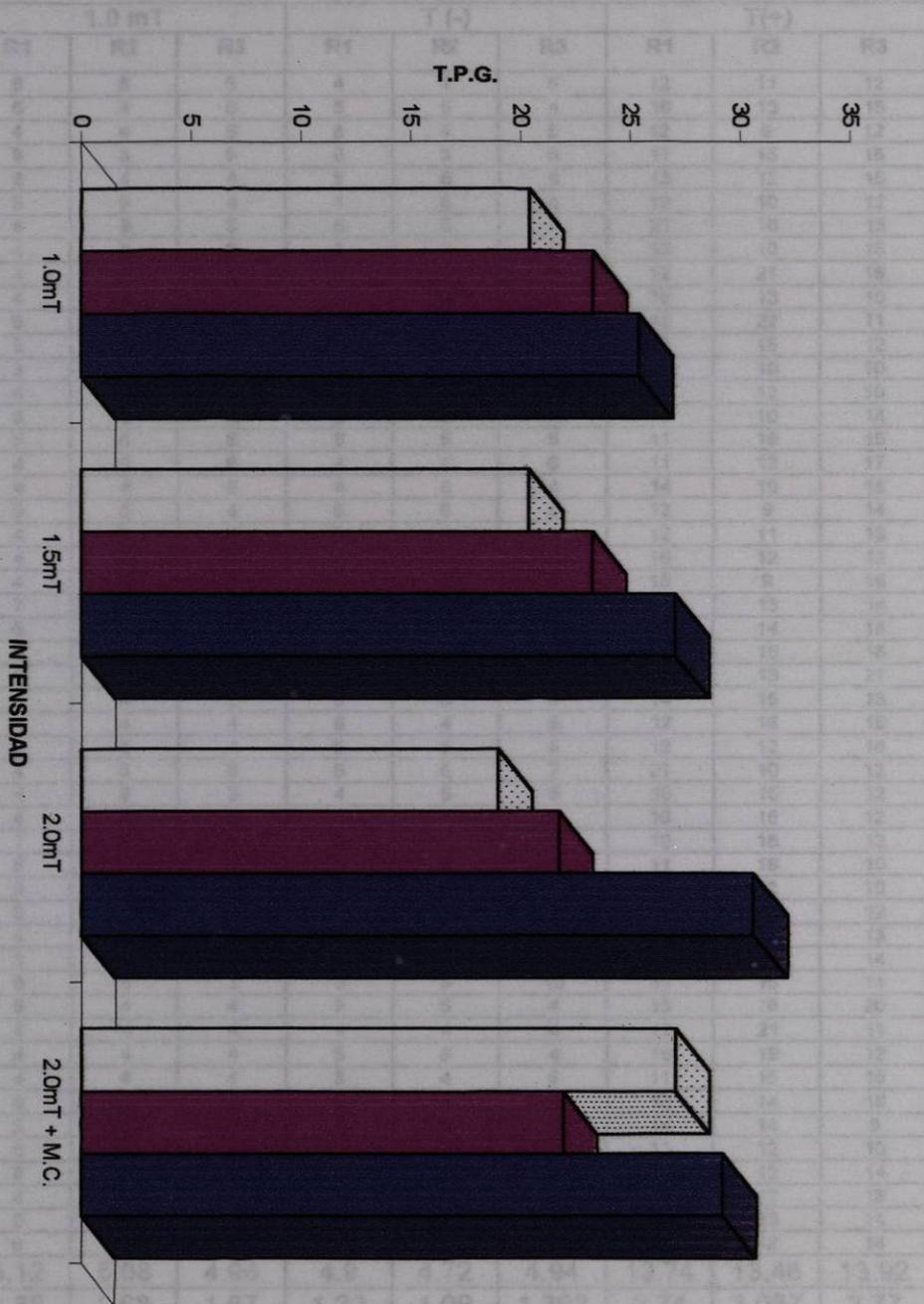


FIGURA 12.- EFECTO DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS SOBRE EL T.P.G. DE LINFOCITOS HUMANOS CULTIVADOS IN VITRO.

R1, R2 Y R3= REPETICIONES
B = TESTIGO NEGATIVO
T1 = TESTIGO POSITIVO
N = MEDIA
DS = DESVIACION ESTANDAR

APENDICE V

TABLAS

TABLA I.- FRECUENCIA DE ICH DEL ANALISIS DE 50 METAFASES DE LINFOCITOS TRATADOS CON LA INTENSIDAD DE CEM DE 1.0 mT.

NUMERO DE METAFASE	1.0 mT			T (-)			T(+)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	6	8	5	4	4	5	12	11	12
2	6	4	6	5	6	4	16	13	15
3	4	4	5	8	4	5	12	9	12
4	8	3	5	6	3	5	11	15	18
5	6	4	4	5	6	6	13	12	15
6	5	5	4	4	6	4	10	10	12
7	6	9	6	8	5	4	21	16	15
8	4	8	8	5	3	5	13	10	15
9	4	7	5	5	4	4	12	21	16
10	4	4	4	4	4	4	16	13	15
11	5	4	4	4	6	5	12	22	11
12	5	5	7	6	4	7	13	15	12
13	3	4	6	4	6	4	14	10	10
14	4	4	3	4	5	4	16	12	10
15	8	6	4	3	5	4	12	10	14
16	5	6	5	5	5	5	11	16	15
17	4	9	6	4	4	6	11	12	17
18	4	8	5	4	6	4	14	10	16
19	5	8	4	5	6	5	13	9	14
20	4	9	4	5	4	4	12	11	13
21	4	4	7	6	3	3	16	12	12
22	4	5	8	5	5	8	15	9	16
23	7	5	4	4	6	6	12	13	14
24	5	6	6	6	6	5	14	14	15
25	8	4	5	5	4	4	16	16	18
26	5	8	9	4	7	5	16	13	21
27	4	4	3	5	6	8	14	15	13
28	4	4	4	6	4	5	12	16	18
29	5	4	4	5	5	5	19	12	18
30	4	8	8	5	6	7	21	10	12
31	4	6	3	4	5	5	15	15	12
32	4	6	9	4	4	4	16	15	12
33	7	4	3	6	3	6	12	18	13
34	5	4	6	5	4	4	11	16	10
35	8	5	3	4	4	4	13	12	10
36	8	3	8	5	3	4	10	12	12
37	4	4	4	3	4	5	11	11	13
38	3	8	6	4	5	5	21	12	14
39	5	5	3	3	5	10	12	15	11
40	5	4	4	3	6	4	13	16	20
41	4	4	4	4	4	4	12	21	11
42	4	4	4	5	6	4	16	19	12
43	4	4	4	8	4	5	11	15	15
44	6	3	4	5	3	5	13	14	18
45	5	2	2	4	5	7	14	14	9
46	6	6	3	8	4	4	11	12	10
47	8	6	4	5	6	4	11	12	14
48	4	4	6	5	6	4	18	12	18
49	6	4	6	6	3	5	13	13	14
50	6	4	4	5	4	4	15	12	14
X	5.12	5.08	4.96	4.9	4.72	4.94	13.74	13.46	13.92
DS	1.39	1.68	1.67	1.22	1.09	1.302	2.74	3.067	2.77

R1,R2 Y R3 REPETICIONES
T(-) TESTIGO NEGATIVO
T(+) TESTIGO POSITIVO
X MEDIA
DS DESVIACION ESTANDARD

TABLA II.- FRECUENCIA DE ICH DEL ANALISIS DE 50 METAFASES DE LINFOCITOS TRATADOS CON UNA INTENSIDAD DE CEM DE 1.5mT.

NUMERO DE METAFASE	1.5 mT			T (-)			T(+)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	4	4	7	4	3	5	10	13	13
2	3	6	8	4	6	5	15	18	14
3	5	5	4	4	7	4	9	12	15
4	5	6	5	3	8	4	12	11	12
5	5	7	7	5	6	3	9	17	12
6	4	4	3	4	3	6	12	9	12
7	4	6	4	5	7	5	10	14	13
8	5	5	3	3	2	7	8	9	14
9	4	5	4	7	5	4	12	10	9
10	4	7	4	4	6	4	10	13	10
11	3	5	6	5	3	6	13	7	10
12	6	3	3	3	3	3	9	20	11
13	4	6	6	6	4	5	13	11	10
14	6	5	5	7	5	6	10	11	13
15	3	5	6	7	4	6	14	10	12
16	4	4	5	3	4	3	14	13	13
17	5	6	5	6	5	4	13	14	13
18	6	3	3	5	3	6	9	10	10
19	3	4	4	4	7	6	11	11	11
20	3	3	3	5	3	8	9	12	12
21	4	4	5	3	6	6	14	13	12
22	5	3	7	6	4	8	11	9	14
23	4	4	5	3	6	6	13	9	10
24	7	3	5	5	3	5	19	10	9
25	5	7	6	5	4	4	12	15	12
26	4	4	4	4	3	5	10	13	12
27	5	5	5	4	7	4	9	11	13
28	5	6	3	5	6	3	9	9	19
29	4	4	3	5	7	5	10	9	10
30	4	5	4	7	5	4	12	13	11
31	3	7	6	5	3	6	13	17	11
32	4	3	6	6	3	5	13	20	12
33	3	5	5	7	5	6	14	11	10
34	5	5	3	6	4	4	9	13	14
35	3	6	3	4	3	6	9	10	12
36	4	3	7	3	6	6	11	12	13
37	4	3	5	3	4	6	19	9	14
38	5	3	6	5	3	4	12	10	12
39	7	3	5	5	4	5	13	15	13
40	5	7	5	6	6	8	14	13	12
41	3	4	3	5	6	8	11	10	11
42	6	4	3	4	3	6	13	13	12
43	4	3	4	6	3	3	14	13	12
44	6	5	4	3	4	6	13	14	13
45	3	3	3	7	4	3	13	9	10
46	4	5	4	6	4	4	12	12	14
47	5	5	3	3	3	7	10	13	12
48	4	6	5	4	6	6	9	13	13
49	5	4	7	3	2	4	9	10	13
50	5	4	6	4	3	5	10	14	12
X	4.4	4.64	4.70	4.68	4.68	5.18	11.64	12.34	11.9 2
DS	1.058	1.276	1.374	1.400	1.617	1.351	2.389	2.790	1.397

R1,R2 Y R3=REPETICIONES
T(-)=TESTIGO NEGATIVO
T(+)=TESTIGO POSITIVO
X= MEDIA ARITMETICA
DS DESVIACION ESTANDARD

TABLA III.- FRECUENCIA DE ICH DEL ANALISIS DE 50 METAFASES DE LINFOCITOS TRATADOS CON UNA INTENSIDAD DE CEM DE 2.0mT.

NUMERO DE METAFASE	2.0 mT			T (-)			T(+)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	4	3	6	3	7	4	11	9	9
2	4	4	7	4	3	5	11	9	10
3	6	3	4	1	6	4	10	10	11
4	3	5	4	7	4	4	13	7	9
5	3	2	7	5	4	2	15	9	10
6	5	4	8	4	4	4	12	11	13
7	3	3	3	4	3	3	13	14	13
8	4	3	5	6	7	5	10	9	9
9	7	3	9	3	4	4	8	11	9
10	7	5	3	4	3	6	15	12	12
11	5	2	5	4	5	5	12	11	9
12	3	5	7	2	7	7	13	9	9
13	6	5	4	5	6	7	16	8	14
14	4	3	6	4	4	4	8	12	12
15	3	2	4	6	3	4	14	10	11
16	5	3	5	5	5	5	12	11	10
17	4	3	6	3	4	6	19	10	9
18	4	3	4	3	4	8	10	12	8
19	6	4	4	3	4	4	16	13	10
20	3	5	6	4	3	5	9	14	10
21	3	3	7	4	6	7	10	9	12
21	4	6	5	4	4	4	9	9	11
23	4	3	4	2	4	4	17	10	13
24	3	5	5	3	5	4	11	9	12
25	5	3	7	4	4	5	16	10	11
26	4	3	6	2	4	3	12	12	9
27	6	6	4	3	5	4	10	9	11
28	3	5	8	4	4	5	11	10	10
29	3	2	3	2	4	3	13	9	13
30	7	3	5	3	3	2	13	12	9
31	5	5	3	3	3	3	13	9	9
32	5	6	7	4	4	4	14	9	14
33	6	3	6	3	5	3	12	12	11
34	3	3	5	2	3	4	11	14	9
35	4	5	4	3	3	4	12	13	10
36	6	3	6	4	4	3	12	12	12
37	3	4	5	5	4	2	10	10	13
38	4	7	5	6	4	3	11	11	11
39	5	3	6	6	4	3	12	11	12
40	3	5	5	4	3	4	12	12	11
41	4	3	5	4	2	4	13	11	14
42	3	6	5	3	6	5	13	12	10
43	4	3	4	3	5	5	14	14	8
44	4	3	5	2	4	2	14	9	10
45	3	6	6	3	3	3	12	9	12
46	6	2	4	4	3	4	12	10	9
47	5	3	3	3	4	3	12	10	12
48	7	3	5	3	4	3	13	9	9
49	7	3	3	4	3	3	14	14	13
50	3	5	7	4	2	3	12	12	10
X	4.46	3.8	5.1	3.72	4.12	4.14	13.00	10.66	10.74
DS	1.314	1.280	1.345	1.217	1.177	1.326	4.024	1.739	1.646

R1,R2 Y R3= REPETICIONES
T(-)=TESTIGO NEGATIVO
T(+)=TESTIGO POSITIVO
X MEDIA ARITMETICA
DS DESVIACION ESTANDARD

TABLA IV.- FRECUENCIA DE ICH DEL ANALISIS DE 50 METAFASES DE LINFOCITOS TRATADOS CON UNA INTENSIDAD DE CEM DE 2.0mT + MITOMICINA C.

NUMERO DE METAFASE	2.0 mT + M.C.			T (-)			T(+)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	14	9	16	5	8	3	9	10	10
2	10	18	11	5	4	3	8	13	12
3	13	14	8	4	3	4	13	14	14
4	11	12	10	5	6	5	10	11	12
5	11	13	11	4	4	4	12	9	12
6	9	12	12	4	8	3	11	10	11
7	11	17	13	4	4	2	11	16	9
8	13	12	10	8	4	4	11	15	12
9	11	11	10	5	4	2	12	10	15
10	11	12	13	5	5	3	13	9	8
11	8	12	9	6	8	3	9	10	9
12	11	10	8	5	3	3	12	12	10
13	12	14	12	4	5	4	12	10	14
14	9	9	9	4	6	2	13	12	13
15	13	16	10	5	3	6	12	10	12
16	10	9	12	5	2	5	14	8	11
17	13	11	11	3	3	6	11	9	10
18	11	20	13	5	4	4	11	10	14
19	9	14	14	4	4	4	10	12	10
20	9	13	12	5	6	3	12	14	12
21	10	12	13	5	5	2	12	9	12
21	10	14	11	5	5	3	11	13	13
23	10	13	12	4	6	3	13	9	15
24	8	12	13	5	4	2	12	17	12
25	10	13	14	4	5	3	13	16	10
26	10	13	9	5	3	3	13	9	12
27	12	12	7	5	4	3	8	14	13
28	14	12	6	4	2	3	8	12	14
29	13	14	10	5	3	5	18	10	10
30	9	11	11	5	4	3	11	9	11
31	11	9	8	4	3	5	12	10	12
32	12	10	11	5	5	3	10	8	12
33	9	12	9	5	6	4	12	12	12
34	10	12	10	4	4	4	14	10	13
35	13	11	10	4	3	5	11	11	11
36	10	9	11	4	2	4	11	10	10
37	10	12	10	6	3	4	14	9	12
38	8	12	9	5	4	2	10	10	12
39	10	13	13	5	4	5	14	15	11
40	12	11	9	8	6	3	9	10	10
41	14	12	11	5	5	3	12	10	12
42	14	9	12	5	5	4	13	10	13
43	10	7	12	5	6	5	12	16	12
44	12	15	11	5	4	4	11	17	13
45	11	12	12	4	4	4	13	11	11
46	13	10	11	6	3	6	13	9	10
47	12	9	10	5	2	5	12	12	9
48	10	12	12	6	3	3	14	14	13
49	12	11	11	5	3	2	11	13	13
50	11	12	16	5	3	5	10	11	12
X	10.98	12.08	10.96	4.86	4.26	3.76	11.66	11.40	11.70
DS	1.693	2.373	2.009	0.894	1.480	1.335	1.817	2.424	1.565

R1,R2 Y R3 REPETICIONES
M.C. MITOMICINA C
T(-)= TESTIGO NEGATIVO
T(+)= TESTIGO POSITIVO
X MEDIA ARITMETICA
DS DESVIACION ESTANDARD

TABLA V.- RESULTADOS DEL INDICE MITOTICO DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 1.0 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	0.045	0.041	0.046	0.044	0.00216
TESTIGO POSITIVO	0.036	0.032	0.036	0.034667	0.0018
1.0 mT	0.061	0.06	0.066	0.062333	0.0026

TABLA VI.- RESULTADOS DEL INDICE MITOTICO DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 1.5 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO POSITIVO	0.034	0.035	0.032	0.033667	0.0012
1.5 mT	0.069	0.065	0.065	0.066333	0.0018
TESTIGO NEGATIVO	0.052	0.058	0.058	0.056	0.0028

TABLA VII.- RESULTADOS DEL INDICE MITOTICO DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 2.0 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	0.052	0.044	0.045	0.047	0.003
TESTIGO POSITIVO	0.034	0.032	0.028	0.031333	0.0024
2.0mT	0.064	0.061	0.06	0.061667	0.0016

TABLA VIII.- RESULTADOS DEL INDICE MITOTICO DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 2.0 mT Y MITOMICINA C

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	0.047	0.048	0.045	0.046667	0.0012
TESTIGO POSITIVO	0.028	0.03	0.033	0.030333	0.002
2.0mT + M.C	0.035	0.036	0.035	0.035333	0.0004

TABLA IX.- RESULTADOS DEL INDICE PROLIFERATIVO POR LA EXPOSICION DE LINFOCITOS HUMANOS A 1.0 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	198	228	212	212.7	12.25
TESTIGO POSITIVO	198	182	187	189	6.68
1.0 mT	231	240	232	234.3	4.02

TABLA X.- RESULTADOS DEL INDICE PROLIFERATIVO POR LA EXPOSICION DE LINFOCITOS HUMANOS A 1.5 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	203	216	199	206	7.257
TESTIGO POSITIVO	182	179	171	177.3	4.642
1.5 mT	240	247	270	252.3	12.81

TABLA XI.- RESULTADOS DEL INDICE PROLIFERATIVO POR LA EXPOSICION DE LINFOCITOS HUMANOS A 2.0 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	216	225	220	220.3	3.68
TESTIGO POSITIVO	157	141	176	158	14.3
2.0mT	250	255	252	252.3	2.05

TABLA XII.- RESULTADOS DEL INDICE PROLIFERATIVO POR LA EXPOSICION DE LINFOCITOS HUMANOS A 2.0 mT Y MITOMICINA C

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	214	229	213	218.7	7.318
TESTIGO POSITIVO	161	160	172	164.3	5.436
2.0mT + M.C	188	185	183	185.3	2.054

TABLA XIII.- RESULTADOS DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 1.0 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	24.24	21.05	22.64	22.64	1.302
TESTIGO POSITIVO	24.24	26.37	25.66	25.42	1.885
1.0 mT	20.79	20	20.68	20.49	0.349

TABLA XIV.- RESULTADOS DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 1.5 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	23.64	22.2	24.2	23.35	0.8424
TESTIGO POSITIVO	26.37	26.81	28.07	27.08	0.7204
1.5 mT	20.79	20.6	19.91	20.43	0.378

TABLA XV.- RESULTADOS DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 2.0 mT

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	22.22	21.33	21.8	21.78	0.363
TESTIGO POSITIVO	30.57	34.04	27.27	30.63	2.764
2.0mT	19.2	18.82	19.04	19.02	0.155

TABLA XVI.- RESULTADOS DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION DE LINFOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A 2.0 mT Y MITOMICINA C

	REPETICION 1	REPETICION 2	REPETICION 3	MEDIA	DS
TESTIGO NEGATIVO	22.42	20.96	22.53	21.97	0.715
TESTIGO POSITIVO	29.81	30	27.9	29.24	0.948
2.0mT + M.C	25.53	25.94	29.81	27.09	1.928



1080098269

