

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

8



**LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 Hz.  
GENERADOS EN SUB-ESTACIONES ELÉCTRICAS  
COMO AGENTES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS  
EN CELULAS DE MAMÍFERO**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**KARLA YADIRA PEREZ LEOR**

**MONTERREY, N. L.**

**JUNIO DE 2002**

TL

QP82

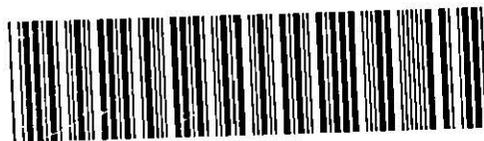
.2

.E43

P4

2002

c.1



1080124433

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 Hz.  
GENERADOS EN SUB-ESTACIONES ELÉCTRICAS  
COMO AGENTES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS  
EN CELULAS DE MAMÍFERO

TESIS

QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE QUÍMICO  
BACTERIOLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA:

KARLA YADIRA PÉREZ LEÓN

MONTERREY, N. L.

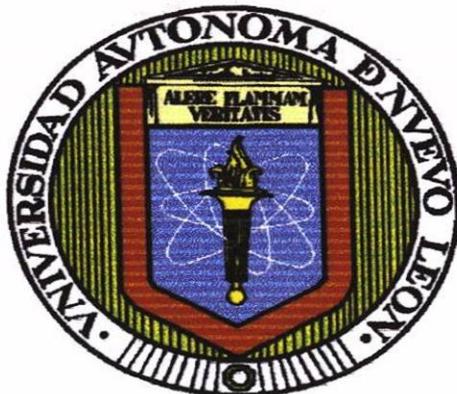
JUNIO DEL 2002

MONTERREY, N. L.

JUNIO DE 2002



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 Hz  
GENERADOS EN SUB-ESTACIONES ELÉCTRICAS COMO  
AGENTES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS EN CÉLULAS  
DE MAMÍFERO**

**T E S I S**

**QUE EN OPCIÓN AL TÍTULO DE QUÍMICO BACTERIÓLOGO  
PARASITÓLOGO**

**PRESENTA**

**KARLA YADIRA PÉREZ LEOR**

**MONTERREY, N. L.**

**JUNIO DEL 2002**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 Hz  
GENERADOS EN SUB-ESTACIONES ELÉCTRICAS COMO  
AGENTES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS EN CÉLULAS  
DE MAMÍFERO**

**COMISIÓN DE TESIS**



**DR. JOSÉ ANTONIO HEREDIA ROJAS**  
**PRESIDENTE**



**MES. MARTHA ALICIA SANTOYO STEPHANO**  
**SECRETARIO**



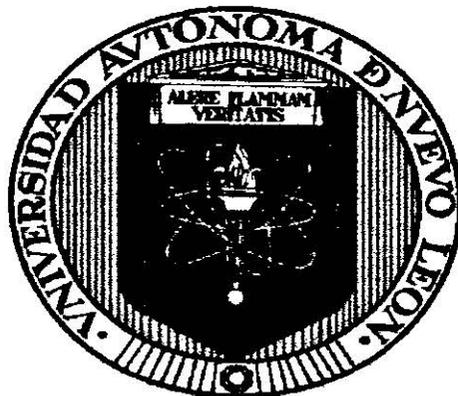
**MC. MA. ESPERANZA CASTAÑEDA GARZA**  
**VOCAL**



**LIC. MARCO ANTONIO GONZALEZ VEGA**  
**SUPLENTE**

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

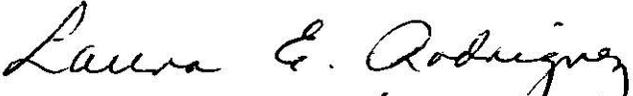
## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



### LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE 60 Hz GENERADOS EN SUB-ESTACIONES ELÉCTRICAS COMO AGENTES GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

#### ASESORES DE TESIS

  
DR. JOSÉ ANTONIO HEREDIA ROJAS  
DIRECTOR INTERNO

  
MC. LAURA E. RODRÍGUEZ FLORES  
DIRECTOR EXTERNO

MONTERREY, N. L.

JUNIO DEL 2002

## **LOCALIZACIÓN Y FINANCIAMIENTO**

**El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Física perteneciente al Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano de la Facultad de Ciencias Biológicas; Sub-estación Eléctrica de Distribución de la Facultad de Ciencias Biológicas y el Laboratorio de Ciencias Morfológicas perteneciente al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina 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 SA595-01 y SA573-01.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios, por estar a mi lado a cada momento, por permitirme llegar hasta aquí y por las personas que ha colocado en mi camino.**

**A mis Padres: Mary y Eugenio por el gran apoyo incondicional brindado en los momentos más importantes de mi vida.**

**A mi hijo Alex y a mi esposo Daniel, por esperarme tan pacientemente durante toda mi carrera. Aquí está el resultado.**

**A mi abuelita Ma. del Refugio y a mis tías: Martha y Sandy, por el invaluable apoyo y ayuda que siempre me han proporcionado en todo momento, así como al resto de la familia Leor García.**

**Al Dr. José Antonio Heredia Rojas por la oportunidad que me brindó de pertenecer a su equipo de trabajo y el apoyo que recibí de él en todo momento.**

**A la MC. Laura Ernestina Rodríguez Flores por la ayuda que me proporcionó durante la realización del presente trabajo.**

**Al Dr. Jesús Ancer Rodríguez, Director de la Facultad de Medicina por las facilidades que me brindó para trabajar en el Departamento de Patología.**

**Al Dr. José Santos García Alvarado, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme el uso de las instalaciones de la sub-estación eléctrica.**

**A todas las personas que me regalaron su sincera amistad durante la carrera: Sandra Iracheta, Blanca Agüero, Jessica Jacobi, Araceli García y Alejandro Vanegas.**

De igual forma a los maestros del Departamento, MES. Martha A. Santoyo Stephano, MC. Ma. Esperanza Castañeda Garza, MC. Abraham Octavio Rodríguez de la Fuente, IQ. Samuel E. Castillo, Lic. Marco Antonio González Vega y Consuelo Garza Valero, por sus muestras de cariño.

A mis compañeros de laboratorio: Alberto, y sobre todo Julián y Alejandro por la importante ayuda proporcionada.

A Eldgar, Evita, César y Dina, Luly, Laura, Luis y Chayito por la forma en que me mostraron su cariño y amistad a pesar de todo.

Al Dr. Mario Morales Vallarta, Gerardo Ramos Alfano, Diana Elia Caballero Hernández y a todas las personas que de alguna u otra manera me apoyaron en la realización de este trabajo, mil gracias.

## INDICE

	Página
<b>RESÚMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>ANTECEDENTES</b>	
Generalidades de Campos Magnéticos	6
Efectos Biológicos de los Campos Magnéticos	8
Técnica de Micronúcleos	12
Micronúcleos y Campos Magnéticos	13
Células Espermáticas y Campos Magnéticos	15
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	18
<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	
Material Biológico	20
Reactivos	20
Cristalería	20
Material e Instrumental Quirúrgico	21
Equipo de Estimulación Magnética	21
Equipo de Laboratorio	21
Prueba de Micronúcleos	22
Obtención y Procesamiento de Médula Ósea	22
Análisis de Células Espermáticas	23
Anomalías en la Morfología del Espermatozoide (AME) y Recuento Espermático (RE)	23
Diseño Experimental	24
Tratamiento Magnético de los Animales	24
Tratamiento del Testigo Positivo con CEM	25
Tratamiento del Testigo Positivo con MMC	26
<b>DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA</b>	
Variable Independiente	26
Variables Dependientes	26
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	27

RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	36
LITERATURA CITADA	37
APÉNDICES	
Apéndice I	46
Apéndice II	48
Apéndice III	53

*Falta tabla  
de abreviaciones!!*

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de los campos electromagnéticos (CEM) oscilantes de 60 Hz producidos en el interior de una sub-estación eléctrica ( $8.8\mu\text{T}$  de intensidad magnética) en eritrocitos de médula ósea y células espermáticas de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo* utilizando la prueba de micronúcleos (MN), anomalías morfológicas del espermatozoide (AME) y recuento espermático (RE). Se realizó una exposición aguda de 72h y una crónica de 240h a la misma intensidad magnética. Cabe señalar que el presente trabajo es el primero realizado en México en lo que concierne a evaluación del efecto genotóxico y citotóxico asociado a sub-estaciones eléctricas. En el tratamiento agudo se utilizó un testigo negativo sin exposición a ningún factor físico o químico, un testigo positivo con Mitomicina C, un mutágeno de acción bien conocida, (MMC, 5mg/kg) y un testigo positivo de CEM de 2.0 mT de intensidad magnética expuestos en laboratorio y que previamente habíamos observado que produce efecto genotóxico. En el caso del tratamiento crónico solo se utilizó testigo negativo.

Posterior a la exposición magnética de cada tratamiento, se realizó la prueba de MN para evaluar el efecto genotóxico y se contabilizó la aparición de éstos cuerpos en 1000 eritrocitos policromáticos, asimismo se revisó las AME en células espermáticas. Para evaluar el efecto citotóxico se realizó el RE.

En el tratamiento *agudo* para el caso de MN, se observó un aumento en su frecuencia en comparación con el testigo negativo. En el caso de AME, no se observó aumento en el porcentaje de anomalías del

grupo tratado en comparación con el testigo negativo. Sin embargo en el RE se observó un aumento en el número de espermatozoides del grupo tratado en relación con el testigo negativo.

Para el caso del tratamiento *crónico* (240h de exposición) se encontró un incremento en la frecuencia de MN en el grupo tratado (8.8 $\mu$ T). Para AME y RE no se encontró diferencia entre los grupos tratado y testigo negativo. Con estos resultados se concluye que ocurre un efecto genotóxico de los campos electromagnéticos oscilantes de 60 Hz producidos en el interior de una sub-estación eléctrica (8.8 $\mu$ T) en médula ósea, pero no hubo efecto genotóxico ni citotóxico en células espermáticas de ratón expuestos por 72h y 240h, en cambio, se observó un incremento en la proliferación celular, reflejado en RE después de una exposición aguda de 72h pero no en la exposición crónica de 240h.

## **INTRODUCCIÓN**

**Los campos electromagnéticos (CEM) se producen cuando una corriente de electrones fluye a través de un conductor, como una línea eléctrica. La mayoría de los humanos estamos expuestos a los CEM, los cuales están presentes tanto en ambientes residenciales como laborales.**

**En la actualidad, la industria depende en gran manera de la electricidad. Las subestaciones eléctricas por su parte, son el medio utilizado en la distribución de esta energía, aunque en un principio estaban alejadas del hombre, éste se ha ido acercando a estas instalaciones que pueden representar un peligro potencial.**

**Se ha tratado de evaluar el efecto producido por los campos electromagnéticos en los seres vivos durante los últimos 20 años, con relación a su posible genotoxicidad y carcinogénesis, sin poder llegar a un consenso general.**

**Por otra parte, existe un gran número de estudios científicos que han evaluado la influencia de los CEM en los organismos. Se ha encontrado evidencia de que la exposición a estos campos puede producir una gran variedad de efectos, entre ellos se mencionan cambios en la tasa de proliferación celular, alteraciones en las propiedades de la superficie celular, en la secreción de la hormona melatonina, etc.**

De gran importancia han sido también los estudios epidemiológicos<sup>x</sup> que han tratado de establecer una relación causal entre la exposición a estos campos y un incremento en algunos tipos de cáncer tanto en niños como en adultos.

Por su parte, la médula ósea ha resultado ser un modelo eficiente en esta área de investigación, tomando como referencia la presencia de micronúcleos (con una frecuencia normal de presentación entre 5–9 en 1000 eritrocitos de ratón *Mus musculus* línea BALB/c) y la variación numérica que pudiera registrarse por exposición a CEM principalmente en células rojas (eritrocitos).

De igual manera, el sistema reproductivo ha servido de indicador en la evaluación de dichos efectos, principalmente en lo relacionado a morfología de la cabeza de los espermatozoides y recuento espermático en ratones machos, aunque la información recaudada es muy escasa y aún menor es el número de estudios relacionados con los posibles efectos de la exposición a los CEM (generados en sub-estaciones eléctricas), los cuales se han enfocado principalmente a los gametos femeninos, por esta razón no existe suficiente información para llegar a una conclusión acerca de los efectos negativos de los CEM sobre los gametos masculinos, aunque la mayoría de los trabajadores en las subestaciones eléctricas son hombres.

En el presente estudio se pretende evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los campos electromagnéticos de 60 Hz, producidos en sub-estaciones eléctricas, en médula ósea y células reproductoras de

ratón *Mus musculus* línea BALB/c expuestos *in vivo*, utilizando la prueba de micronúcleos, en el caso de la médula ósea; revisando morfología del espermatozoide y realizando un recuento de células espermáticas en lo que concierne a células germinales reproductoras.

## ANTECEDENTES

### Generalidades de Campos Magnéticos

Wood (1991), señala que en los tiempos de Tales de Mileto (640 – 546 a. C.C.), el hombre hablaba de atracciones magnéticas. Desde hace más <sup>de</sup> dos mil años, los chinos utilizaron la brújula magnética para orientarse en sus viajes marítimos y por los desiertos de Mongolia. Como es sabido, el fundamento de la brújula es adoptar una orientación, la cual está dada por un campo magnético periférico.

El físico danés Hans Christian Oersted, en 1820, observó que la orientación de la aguja de una brújula puede cambiar por la acción de una corriente eléctrica de forma semejante a como lo hacía <sup>con</sup> un imán. Esto lo llevó a pensar que alrededor de un conductor de electrones se forma un campo que se manifiesta como un imán, siendo así como relacionó el magnetismo con la electricidad (Galar–Castelan, 1988).

Un campo magnético se define como la región en el espacio en el que un objeto magnetizado puede, a su vez, magnetizar a otros cuerpos.

De acuerdo a la distribución de su intensidad se pueden clasificar en:

- a) Homogéneos: en donde la intensidad del campo es uniforme.
- b) Heterogéneos: en donde la intensidad disminuye proporcionalmente con la distancia del centro.

Y de acuerdo a <sup>si</sup> ~~si~~ son constantes o variables en el tiempo se clasifican en:

qué???

- a) Campo Estático: las líneas de fuerza y su dirección son constantes en el tiempo.
- b) Campo Oscilante: la carga se alterna en cada impulso a la vez que la intensidad que estos también varían.

Tomando en cuenta ambas clasificaciones, el efecto de los campos magnéticos sobre los diversos sistemas biológicos dependerá de <sup>si</sup> el campo es homogéneo, heterogéneo, estático u oscilante (Pothakamury y cols. 1993).

Por otro lado, un campo eléctrico se origina por cargas eléctricas estáticas. Cuando el campo magnético y eléctrico en una región determinada varían en el tiempo, ambos se relacionan de tal manera que todo campo eléctrico que varíe con el tiempo, siempre va acompañado de un campo magnético también variable y viceversa, por lo tanto, el así llamado **campo electromagnético**, es resumido por Parker (1993) como la interrelación entre campo eléctrico y magnético en una sola entidad física.

Según Stewart (1979), <sup>en</sup> en general para la transmisión de corriente alterna (A. C.) <sup>en</sup> en Norteamérica <sup>la</sup> la frecuencia ~~de~~ de 60 Hertz (Hz); <sup>para</sup> para Europa y otras regiones <sup>es</sup> es ~~de~~ 50 Hz, entendiéndose por *frecuencia* el número de ciclos completos por unidad de tiempo. En el Sistema Internacional de Unidades 1 ciclo/1 seg. equivale a 1 Hz.

segundo es s, no seg.

Por otra parte, en un campo magnético la fuerza esta dada por la densidad de flujo magnético (también llamada *intensidad magnética*), siendo esta el número de líneas de fuerza que pasan por unidad de área. La unidad en el sistema sexagesimal para la intensidad magnética es el *oersted (Oe)* establecido en 1932 por acuerdo internacional, como sustituto de *gauss (G)*, aunque sigue utilizándose más éste ultimo en la literatura. Para el Sistema Internacional de Unidades la densidad de flujo magnético está dada en *Teslas (T)*, en donde cada T equivale a 10,000 gauss (Galar-Castelán, 1988).

A su vez, la intensidad de un campo magnético depende no solo de una variable eléctrica, sino además de la distancia, su magnitud se relaciona directamente con el flujo de corriente (medido en amperes) y es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia. En forma similar, la magnitud del campo eléctrico está en proporción directa al voltaje y decrece conforme la distancia aumenta (Morales–Matamoros, 1997).

### **Efectos Biológicos de los Campos Magnéticos**

A finales de los años 70's se comenzó a presentar evidencia epidemiológica que indicaba un posible incremento en la frecuencia de varios tipos de cáncer, principalmente leucemia, cáncer de mama y tumores cerebrales debido a la exposición a CEM generados por líneas de abastecimiento eléctrico (Schreiber y cols. 1993; Wertheimer y Leeper, 1979).

Por otro lado, 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 señalar la importancia en distintos procesos fisiológicos que tiene este mecanismo de flujo intermembranal como transmisor de señales del exterior al interior de la célula. Un estudio realizado en 1988 por Mishima, en donde expuso ratas hembras no osteoporósicas a CEM pulsantes por seis meses, reveló un incremento en el volumen y actividad en la formación de hueso en las patas traseras.

En la evaluación de los efectos de los campos electromagnéticos, otro modelo importante ha sido la síntesis y secreción de la hormona melatonina por la glándula pineal, para tratar de observar algún mecanismo promotor o inductor del cáncer, ya que se ha observado que al aumentar los niveles de esta hormona el nivel de estrógenos disminuye, reduciendo de esta manera el riesgo de desarrollar cáncer de mama, sin embargo el nivel y secreción de la hormona disminuye al estar bajo la influencia de un campo electromagnético (Kato y cols. 1993; 1994).

Sin embargo, Davis (1992), señala que no existe un consenso general actual acerca de si estos cambios son fisiológicamente significativos.

En 1988, Thomson y cols. realizaron un implante de células leucémicas en hembras de ratones y las expusieron a un campo magnético de 60 Hz, de  $1.4\mu\text{T}$  por 3 horas diarias antes del implante, posterior a este, de 6 horas diarias, cinco días por semana haciendo un total de ocho semanas. No se encontró al final de este tiempo un efecto en la incidencia o progresión de la leucemia en los ratones sobrevivientes.

Asimismo, Fajardo-Gutiérrez y cols. (1993) <sup>señalan</sup> en un estudio realizado en niños con leucemia que vivían en zonas cercanas a donde se producían CEM fueron más afectados que los que vivían alejados de los cables de alto voltaje.

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

En una investigación realizada por Prasad y cols. (1984) con ratones machos de la línea BALB/c que fueron expuestos por una hora a un campo magnético estático de 7.05 kG originado por Resonancia Magnético Nuclear (RMN), evaluaron aberraciones cromosómicas en médula ósea, y encontraron que todos los grupos expuestos

presentaron una razón de 0.02 aberraciones aparentes por célula, éstas se presentaron en forma de cromosomas metacéntricos resultantes de la unión de los centrómeros de cromosomas. Estos investigadores, sin embargo, concluyeron que los resultados no advierten acerca de efectos citogenéticos significativos en médula ósea por la exposición a RMN.

Otras investigaciones realizadas acerca del efecto de campo eléctrico y magnético sobre la estructura del DNA (ácido desoxirribonucleico) en células de ovario de hamster chino (CHO) y en células humanas de la línea K562, señalan no haber detectado efectos medibles al aplicar campos de baja intensidad (Reese y cols. 1988; Fiorani y cols. 1992). No obstante, en 1995 Mitnik y cols. reportan cambios a nivel fisicoquímico en la conformación del ADN al someterse a la acción de un campo eléctrico.

Nordenson y cols. (1994) expusieron células amnióticas humanas a un campo magnético sinusoidal de 50 Hz y  $30\mu\text{T}$  por 72 horas con los resultados mostraron que la exposición permanente al tiempo e intensidad magnética empleada no incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Por otra parte, Lorimore y cols. (1990) realizaron estudios en ratones susceptibles a la inducción de leucemia mieloide aguda por radiación ionizante, éstos fueron expuestos durante un período de 19 días a un CEM de 50 Hz y 2.0 mT, y no encontraron un efecto

significativo que revelara asociación entre los campos electromagnéticos y la leucemia mieloide aguda.

### **Técnica de Micronúcleos**

Por mucho tiempo, los micronúcleos fueron conocidos 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 conservaban todavía gran cantidad de ácido nucleico, por lo que adquieren una tonalidad azul al teñirlos con colorante de Wright, contrastando con el color rojizo de los eritrocitos normocromáticos (ENC). Esta observación originó la llamada prueba de micronúcleos, al observar éstos como la principal alteración en médula ósea de hamsters tratados con un agente mutagénico (Boller y Schmid, 1970; Schmid, 1975).

Rooney y Czepullowski (1992) mencionan que los micronúcleos (MN) se asemejan al núcleo en propiedades de tinción y forma, variando en tamaño ampliamente. Son cuerpos redondeados de origen nuclear encontrados en el citoplasma. Se originan de fragmentos acéntricos excluidos del núcleo hijo durante la división celular; pueden formarse también por cromosomas enteros que se rezagaron durante las divisiones celulares precedentes debido a que no alcanzaron a unirse al huso acromático. Señalan además, que la simplicidad de la técnica, su fácil determinación y adecuada sensibilidad la hicieron una muy valiosa prueba en ensayos de mutagenicidad siendo establecida primero en médula ósea de roedores y luego se amplió a los linfocitos humanos.

Asimismo, Vijayalaxmi-Seaman y cols. (1999), mencionan que los EPC expresados en porcentaje de aparición con respecto a los ENC, son un buen indicador del tiempo requerido para que una célula eritropoyética nucleada pierda el núcleo y se convierta en un EPC y así evaluar la maduración y división de las células eritrocíticas.

### **Micronúcleos y Campos Magnéticos**

Nordenson y cols. en 1984, realizaron una de las primeras investigaciones para evaluar genotoxicidad producto de un efecto clastogénico ocasionado por los campos electromagnéticos midiendo los 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, sin embargo al exponer linfocitos en cultivo de sangre periférica a 50 Hz con 1 mA/cm<sup>2</sup>, se encontró que no inducía ningún daño al material genético.

Por otra parte, en un estudio más reciente de estos mismos autores (Nordenson y cols.,1988), se evaluaron aberraciones cromosómicas y células micronucleadas en 38 trabajadores de una sub-estación eléctrica, y se observó que al ser comparados con un grupo control, los trabajadores expuestos presentaron un incremento significativo en aberraciones cromosómicas y células con MN.

El Nahas y Oraby en 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.

En otro estudio realizado por Tofani y cols. (1995) se encontró que la exposición de linfocitos humanos a campos de  $140\mu\text{T}$  a 50 Hz o a campos de 75 ó  $150\mu\text{T}$  a 32 HZ, con el campo geomagnético anulado no mostraban un incremento en la formación de micronúcleos. Asimismo, cuando no se anulaba el campo geomagnético ( $42\mu\text{T}$  en paralelo al campo AC) no se observó incremento significativo de células micronucleadas.

Scarfi y cols. (1999), señalaron que en recientes estudios sobre la inducción de MN y proliferación celular en linfocitos humanos en cultivo, expuestos a un campo magnético sinusoidal de 50 Hz por 72 horas a intensidades de 0.05 a 1.0 mT, no se encontró efecto genotóxico a las densidades de flujo magnético utilizadas, pero, el índice de proliferación celular se consideró incrementado significativamente en todas las intensidades utilizadas.

Abramsson-Zetterberg y cols. (2001), realizaron un estudio para evaluar los efectos en los cromosomas y eritrocitos de ratones CBA/Ca en estado prenatal y estado adulto, expuestos a campos magnéticos de 50 Hz y  $14\mu\text{T}$  de intensidad por 18 días, utilizando la técnica de micronúcleos con citometría de flujo. Los resultados indicaron que la exposición a campos electromagnéticos no indujeron efectos en los cromosomas ni aumento en los niveles de eritrocitos micronucleados.

## **Células Espermáticas y Campos Magnéticos**

Según Wyrobek y cols. (1979), la morfología de la célula espermática proporciona una manera rápida y sencilla de cuantificar los efectos de agentes ambientales sobre células germinales. Numerosos mutágenos, teratógenos y carcinógenos han demostrado inducir aumentos marcados en la fracción de espermatozoides con anomalías en la cabeza.

Este mismo grupo de trabajo (Wyrobek y cols. 1983), evaluó la relación entre los cambios en la morfología del espermatozoide y la mutagenicidad de diversos agentes y encontraron que la prueba de morfología de espermatozoides es altamente sensible a los mutágenos de células germinales. Por otro lado, existen evidencias preliminares que sugieren que estos cambios pueden ser transmitidos a las generaciones siguientes (Hugengoltz y Bruce, 1983).

En un estudio citado por Tablado-Almela (1996), se revisó la motilidad y patrones de desplazamiento espermático. Los resultados obtenidos mostraron cambios en ambos parámetros para todos los grupos empleados, la motilidad y los patrones de desplazamiento no fueron afectados por el tratamiento de un campo magnético estático de 0.7 T de intensidad, además la producción espermática no presentó cambios.

Asimismo, este mismo grupo de investigadores en 1998, llevó a cabo un estudio sobre los posibles efectos del imán comercial (Terapión Plus) sobre las características morfológicas y morfométricas

de los espermatozoides de ratón. Según los resultados obtenidos, estos parámetros no se mostraron afectados por la exposición a los campos magnéticos estáticos (0.7T), aunque mencionan una posible alteración en el proceso espermatogénico (Tablado–Almela y cols. 1998).

En un estudio reciente, Elbetieha y cols. (2002), expusieron ratones macho y hembra adultos a campos magnéticos sinusoidales de 50 Hz, aproximadamente 25 $\mu$ T durante 90 días y señalan no encontrar efectos adversos en la fertilidad y reproducción de los animales expuestos.

Por otro lado, el recuento espermático es el primer examen realizado para evaluar la fertilidad de una pareja. Se han establecido algunas normas regularizadas en dicho recuento de hombres fértiles, salvo en la azoospermia, no existe límite específico para confirmar la ausencia de fertilidad del esperma. Además existen otros criterios en el recuento espermático tales como la morfología y movilidad del esperma siendo este último el que puede marcar la diferencia entre una persona fértil o infértil. Cualquier anomalía relacionada con alguno de estos criterios compromete severamente la habilidad del espermatozoide para fertilizar (Segalen, 1989).

En cuanto a los efectos de campos magnéticos y el recuento espermático, Furuya y cols. (1998), sometieron ratones machos de 7 semanas de edad a CEM de 50 Hz y 1.0 mT de intensidad. Grupos de 7 ratones fueron expuestos por 13, 26, 39 y 52 días. Encontraron que

si hay un efecto adverso en la proliferación y diferenciación de espermatogonias durante la espermatogénesis.

Asimismo, Shaw (2001), reporta resultados de una investigación bibliográfica en relación con la epidemiología de los efectos adversos entre reproducción y la exposición a campos eléctricos y magnéticos. Esta revisión en general concluye que falta evidencia para asociar problemas de reproducción en mujeres, tales como problemas en el embarazo y abortos. Es necesario realizar más investigaciones en esta área para llegar a una conclusión científica válida.

Por otra parte en un estudio más reciente, pero con radiación ionizante, Konoplia y cols. (2002), examinaron el estado morfofuncional del sistema reproductor de ratas machos después de someterlas a una exposición crónica de baja intensidad con radiación gamma a una dosis total de 1.0 Gy. Los resultados obtenidos mostraron una alteración en la morfología, en el ADN y descoordinación en el metabolismo de las células espermáticas 180 días después de la exposición.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

Los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia generados en el interior de una sub-estación eléctrica, son potencialmente capaces de producir efectos genotóxicos y citotóxicos en eritrocitos de médula ósea, así como cambios en la morfología y recuento de células espermáticas de ratón *Mus musculus* línea BALB/c *in vivo*.

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de los campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia generados en sub-estaciones eléctricas utilizando la prueba de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea, además del análisis de la morfología y recuento de células espermáticas de ratón *Mus musculus* línea BALB/c *in vivo*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto genotóxico de los CEM de 60 Hz de frecuencia a una densidad de flujo magnético de  $8.8\mu\text{T}$  a las 72h y 240h 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 aguda de 72h y 240h a CEM de 60 Hz y  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad sobre células espermatogénicas de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c mediante el % de anomalías morfológicas del espermatozoide (AME) .

↳ porcentaje

3. Evaluar el efecto citotóxico de una exposición crónica de 72h y 240h a CEM de 60 Hz y  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad sobre células espermáticas de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c mediante el recuento espermático (RE).

## MATERIAL Y MÉTODO

### Material Biológico

Se utilizaron 36 ratones macho *Mus musculus* línea BALB/c de entre 10 y 12 semanas de edad procedentes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### Reactivos

- Medio RPMI (GIBCO)
- Suero Fetal Bovino (GIBCO)
- Solución Salina 0.9%
- Solución Fijadora
- Buffer de Fosfatos pH 7.4
- Buffer de Fosfatos pH 6.8
- Heparina (proporcionada por el Sector Salud)
- Colorante Wright 0.3% (CTR)
- Eosina Y al 5% (SIGMA Chemical Co.)
- Alcohol etílico 70% (Baker Chemical Co.)
- Mitomicina C (SIGMA)

Ver Apéndice I, donde se especifica la preparación de los reactivos.

### Cristalería

- Tubos cónicos de vidrio para centrífuga de 15 ml
- Tubos de ensayo de 13 x 100
- Pipetas de vidrio

- Pipetas Pasteur
- Bulbos de hule para pipeta Pasteur
- Cajas Petri de vidrio
- Portaobjetos
- Cámara de Neubauer

### **Material e Instrumental quirúrgico**

- Jeringas de 3 ml (22 x 32 mm, PLASTIPAK)
- Jeringas de 100 U para insulina con aguja (29 x 13 mm, PLASTIPAK)
- Estuche de Disección
- Gasas
- Mallas de cobre de 200 mesh

### **Equipo de Estimulación Magnética**

- Bobina de 27 X 71 cm de 552 vueltas de alambre de cobre esmaltado # 14
- Autotransformador variable CONTROVAC – AC modelo A8.cp
- Transformador variable de 140 Volts y 7.5 Amperes (marca genérica)
- Osciloscopio de 2 canales marca BK modelo 2120 N° serie 20101787
- Gausímetro Bell FW6010 N° serie 9916002

## **Equipo de Laboratorio**

- Centrífuga Clay Adams modelo DINAC II N° serie 251086
- Microscopio óptico VanGuard 1221 CM N° serie 001852

## **Prueba de Micronúcleos (MN)**

### *Obtención y procesamiento de médula ósea*

Después de la exposición de los grupos, se procedió al sacrificio del animal por dislocación cervical para extraerle los fémures a los cuales se les retiró el músculo y se les cortaron los extremos para dejar visible el canal medular.

Se insertó la aguja de una jeringa que contenía 3 ml de medio RPMI y 0.2 ml de heparina y se introdujo a través del canal medular con el fin de arrastrar la médula hacia un tubo de centrífuga. La muestra se agitó rápidamente para evitar coagulación.

Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

Se realizó un lavado con 2.5 ml de medio RPMI. Se centrifugó y eliminó el sobrenadante de nuevo. Esto se repitió 2 veces más.

Finalmente se le agregó al precipitado 1 a 2 gotas de suero fetal bovino y se resuspendió nuevamente para realizar la extensión de la muestra por barrido sobre un portaobjetos.

Las laminillas se tiñeron con colorante Wright por 5 minutos, se lavaron y se dejaron secar.

La frecuencia de micronúcleos se cuantificó en 3000 eritrocitos por ratón y se expresó como el valor de MN por cada 1000 células. El análisis se llevó a cabo en el microscopio en objetivo de 100x con aceite de inmersión. (Ver Apéndice II, Fig. 1)

## **Análisis de Células Espermáticas**

La muestra de interés se obtuvo de los mismos animales usados para la prueba de micronúcleos. Con un bisturí se realizó una incisión ventral en dirección longitudinal y se extrajo el epidídimo y conducto deferente de ambos testículos.

### **Anomalías en la Morfología del Espermatozoide (AME) y Recuento Espermático (RE)**

Para realizar el conteo espermático y revisar la morfología de la cabeza del espermatozoide, las muestras fueron colocadas en una solución amortiguadora de fosfatos para luego ser maceradas.

Posteriormente, se filtró la suspensión obtenida utilizando una malla colocada en la aguja de la jeringa. Se tomó una muestra del filtrado con una pipeta Pasteur y se colocó en la cámara de Neubauer para recuento espermático, el cual se expresa en número de espermatozoides totales por mililitro. Con el resto del filtrado se procedió a realizar frotis, los cuales se dejaron secar por 12 horas, luego se sumergieron en una solución fijadora por una hora, se lavaron con agua, se sumergieron en Eosina Y al 5% por una hora y por último se pasaron por etanol absoluto para eliminar el exceso de colorante.

Se cuantificaron 300 células por ratón para determinar el porcentaje de espermatozoides con cabeza morfológicamente alterada. (Ver Apéndice II, Fig. 2)

## **Diseño Experimental**

Para todos los tratamientos y testigos se manejaron 6 repeticiones, como sigue:

- Exposición aguda de 8.8 $\mu$ T por 72h.
  - Testigo negativo, no expuesto a factores físicos o químicos
  - Testigo positivo tratado con CEM de 2.0 mT
  - Testigo positivo tratado con MMC
- Exposición crónica de 8.8 $\mu$ T por 240h.
  - Testigo negativo crónico no expuesto a factores físicos ni químicos.

## **Tratamiento Magnético de los Animales**

El grupo tratado fue colocado en el interior de una subestación eléctrica de distribución tri-fásica de 220 volts constituida por tres transformadores: uno de 150 KVA (KiloVolts-Amperes), uno de 225 KVA y otro de 500 KVA (Fig. 3- Apéndice II).

Para protección cada transformador consta de 3 fusibles, además de 3 conos de alivio para toda la subestación a donde llega el alto voltaje (13200 volts).

Los animales se distribuyeron en jaulas de acrílico, un animal por jaula (Fig. 4 y 5-Apéndice II), y estas a su vez se colocaron en una jaula de plástico para su protección la cual se instaló a un costado del transformador central sobre una base. La medición dentro de la subestación se llevó a cabo utilizando un gausímetro Bell FW 6010 el cual cuenta con una sonda de alta sensibilidad. Esta sonda se colocó

de diferentes maneras hasta que se obtuvo el mayor valor del campo magnético posicionándola de forma vertical en base al suelo y paralela al transformador central. En la periferia se procedió de igual manera.

El grupo no tratado fue colocado en la periferia interna de la subestación donde el valor del CEM fue de  $0.3\mu\text{T}$ , considerada esta intensidad muy inferior con respecto a los aparatos electrodomésticos comúnmente usados.

### **Tratamiento del Testigo Positivo con Campos Electromagnéticos**

Los ratones utilizados como testigo positivo fueron colocados en el interior de un solenoide formado de 552 vueltas de alambre de cobre # 14, enrollado en una matriz de plástico de 27 x 71 cm, el cual fue alimentado por una corriente eléctrica que provenía de una fuente de corriente alterna de 60 Hz a la cual se le conectó un autotransformador variable CONTROVAC-AC modelo A8. cp. con una entrada de 120 volts y 12 amperes. Esto a su vez unido a un transformador reductor que permitió manejar el amperaje necesario para producir la intensidad magnética de 2.0 mT. Para la calibración del solenoide se utilizó el mismo gausímetro usado en la subestación eléctrica (Bell FW 6010). Los criterios para caracterizar el CEM incluyen la frecuencia de la onda y la geometría de la exposición. Todo el procedimiento se realizó en base a un investigación previa realizada por Ramos-Alfano, (2000), quien encontró un incremento de células micronucleadas al exponer ratones a la intensidad de 2.0 mT.

## **Tratamiento del Testigo Positivo con MMC**

Se empleó el compuesto químico Mitomicina C (MMC) como testigo positivo debido al efecto genotóxico que provoca en eritrocitos de médula ósea según Matter y Granwiler, (1975). Se eligió una concentración de 5mg/kg debido a que es la de mayor poder de inducción de micronúcleos de acuerdo a Montes de Oca-Luna (1982).

Se realizó una aplicación única del mutágeno suspendido en suero fisiológico, inyectándolo por vía intraperitoneal.

## **Definición de Variables y Unidades de Medida**

### **Variable Independiente**

- Intensidad del CEM de  $8.8\mu\text{T}$  por 72h y 240h de exposición

### **Variables Dependientes**

- Frecuencia de micronúcleos (# MN/1000 células)
- Porcentaje de anomalías en la morfología del espermatozoide
- Recuento espermático (# de espermatozoides totales/mililitro)

La frecuencia de micronúcleos se cuantificó en 1000 eritrocitos por ratón, se determinó el número de ellos que presentaron inclusiones nucleares (micronúcleos) ya que son indicadoras de efecto

genotóxico. El análisis se llevó a cabo en un microscopio con objetivo de 100x con aceite de inmersión.

El porcentaje de anomalías se cuantificó en 300 células espermáticas por ratón y el recuento espermático se reporta como número de células por mililitro.

## **Análisis Estadístico**

Todos los resultados fueron analizados con la ayuda del paquete SPSS versión 8.0 (Ferran-Aranaz, 1996).

La prueba de Kolmogorov-Smirnov mostró normalidad para las variables Frecuencia de MN (FMN) % AME y # de Espermatozoides Totales/mililitro (RE). Para el caso de la variable FMN del tratamiento agudo (72h), se realizó un análisis de varianza (Anova) para detectar diferencias entre grupos y una prueba de Tukey para ver cual de los grupos marcaba la diferencia. Para el tratamiento crónico (240h) de FMN, se aplicó la prueba de "t" para detectar la diferencia entre los grupos. Para la variable % AME del tratamiento agudo los valores fueron transformados aplicando el Arcoseno (Zar, 1996) por tratarse de porcentaje y posteriormente se les aplicó un análisis de varianza (Anova) y la correspondiente prueba de Tukey. Para el tratamiento crónico de % AME se aplicó la prueba de "t" para detectar la diferencia entre los grupos.

Para la variable RE del tratamiento agudo se aplicó un análisis de varianza (Anova) y la prueba de Tukey. Para el tratamiento crónico de RE se aplicó la prueba de "t" para determinar la diferencia entre los grupos.

## RESULTADOS

En la Tabla I, se muestran los resultados de la prueba de micronúcleos de ratones expuestos a un tratamiento agudo (72h) y otro crónico (240h) así como los testigos correspondientes.

En el tratamiento agudo de  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad y 72h de exposición al realizar el análisis de varianza y la prueba de Tukey y se encontró que hay diferencia significativa entre los grupos con  $F=156.46$  ( $p<0.01$ ). El valor de la media y de la desviación estándar del tratamiento y del testigo negativo fueron de  $10.11 \pm 1.168$  y  $7.77 \pm 0.65$  respectivamente. Observando estos resultados se aprecia un aumento en el número de células micronucleadas lo que se traduce como un efecto genotóxico de los CEM en las células de médula ósea.

La comparación realizada en el tratamiento crónico de  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad y 240h por medio de la prueba de "t" mostró un incremento significativo entre el tratamiento y el testigo negativo con una  $t=12.77$  ( $p<0.01$ ). Sus medias y desviaciones estándares fueron de  $10.27 \pm 0.95$  y  $4.88 \pm 0.040$  respectivamente. Esta exposición se contrastó con un testigo negativo solamente, para evitar una posible muerte por intoxicación crónica de los animales con MMC. Con estos resultados se puede asumir que al igual que en el tratamiento agudo, existe un efecto genotóxico de los CEM sobre las células eritrocíticas de ratón. Por otra parte, en la Tabla II se muestran los resultados de las pruebas de anomalías morfológicas del espermatozoide (AME) y del recuento espermático (RE) en ratones expuestos a un tratamiento agudo (72h) y otro crónico (240h) así como los testigos correspondientes.

La comparación del tratamiento agudo de  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad y 72h de exposición para AME se realizó con un Anova y la prueba de Tukey mostrando una diferencia significativa entre los grupos con un valor  $F=36.42$  ( $p<0.01$ ). Con la prueba de Tukey no se encontró diferencia entre el tratamiento y el testigo negativo, sin embargo, el grupo T(+) MMC si presentó un aumento en los porcentajes de anomalías con una media y desviación estándar de  $0.35 \pm 4.72 \times 10^{-2}$  ( $p< 0.01$ ). Para el mismo tratamiento pero en el RE se aplicaron las pruebas de Anova y Tukey y los resultados mostraron un aumento en el recuento espermático en el grupo tratado con respecto al testigo negativo con  $F=103.14$  ( $p<0.01$ ). La media y desviación estándar del grupo tratado fue de  $20.08 \times 10^6 \pm 80.31 \times 10^6$  y del testigo negativo fue de  $17.30 \times 10^6 \pm 14.39 \times 10^6$ .

En el caso del tratamiento crónico de los grupos de AME se compararon con una prueba de "t" la cual mostró que no hay diferencia significativa entre el grupo tratado y el testigo negativo con una  $t=-2.11$  ( $p>0.05$ ). La media y desviaciones estándares de ambos grupos fueron de  $0.20 \pm 2.07 \times 10^{-2}$  y  $0.24 \pm 3.26 \times 10^{-2}$  respectivamente. Por lo tanto se asume que, no se presentó efecto genotóxico de los CEM sobre espermatozoides de ratón.

Para el mismo tratamiento pero en el RE no se encontró diferencia significativa entre los grupos con  $t=1.46$  ( $p>0.05$ ). Por los resultados obtenidos, se presume que no hay efecto citotóxico (producción celular anormal) de los CEM utilizados sobre espermatozoides de ratón. La exposición crónica para AME y RE (al igual que en MN), fue

contrastada con un testigo negativo solamente, para evitar una posible muerte por intoxicación crónica de los animales con MMC.

<b>TRATAMIENTO AGUDO (72h)</b>	<b>MEDIA DE LA FRECUENCIA DE MN EN 1000 EPC ( ± DE)</b>
CEM 8.8 $\mu$ T	10.11 (1.16)*
T (-)	7.77 (0.65)
T (+) CEM	15.89 (1.22)*
T (+) MMC	20.00 (1.19)*
<b>TRATAMIENTO CRONICO (240h)</b>	
CEM 8.8 $\mu$ T	10.27 (0.95)*
T (-)	4.88 (0.40)

**Tabla I.** Resultados de la evaluación del efecto genotóxico mediante la prueba de MN obtenidos de la exposición aguda y crónica de eritrocitos de médula ósea de ratón *in vivo* a CEM, expresados en media aritmética con desviaciones estándares.

T(-): Testigo Negativo. Animales no expuestos a CEM y que fueron colocados en la periferia de la subestación donde se detectó un campo magnético de 0.3 $\mu$ T . T(+) CEM: Testigo Positivo tratado con CEM de 2.0 mT. T(+) MMC: Testigo Positivo tratado con MMC 5 mg/kg.  $\pm$  DE : Desviación Estándar. (en el Apéndice III-Tablas A y B se presentan los resultados originales). \*Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) comparado con el testigo negativo.

TRATAMIENTO AGUDO (72 HORAS)	MEDIA ARITMÉTICA % AME (± DE)	MEDIA ARITMÉTICA RE (± DE)
CEM 8.8 μT	0.21 (1.32x10 <sup>-2</sup> )	20.08 x 10 <sup>6</sup> (8.03 x 10 <sup>5</sup> )*
T (-)	0.19 (3.72x10 <sup>-2</sup> )	17.30 x 10 <sup>6</sup> (14.39 x 10 <sup>5</sup> )
T (+) CEM	0.17 (2.66x10 <sup>-2</sup> )	10.65 x 10 <sup>6</sup> (7.24 x 10 <sup>5</sup> )*
T (+) MMC	0.35 (4.72x10 <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup>	12.37 x 10 <sup>6</sup> (10.82 x 10 <sup>5</sup> )*
<b>TRATAMIENTO CRONICO (240 h)</b>		
CEM 8.8 μT	0.20 (2.07x10 <sup>-2</sup> )	19.88 x 10 <sup>6</sup> (12.91x 10 <sup>5</sup> )
T (-)	0.24 (3.26x10 <sup>-2</sup> )	19.04 x 10 <sup>6</sup> (5.56 x 10 <sup>5</sup> )

**Tabla II.** Resultados de la evaluación del efecto genotóxico (%AME) y citotóxico (RE) en células germinales de ratón *in vivo* expuestos a CEM, expresados en media aritmética con desviaciones estándares. T(-): Testigo Negativo. Animales no expuestos a CEM y que fueron colocados en la periferia de la subestación donde se detectó un campo magnético de 0.3μT . T(+) CEM: Testigo Positivo tratado con CEM de 2.0 mT. T(+) MMC: Testigo Positivo tratado con MMC 5 mg/kg. ± DE : Desviación Estándar. (en el Apéndice III-Tablas C , D, E y F se presentan los resultados originales).

<sup>a</sup>: Tratamiento que marcó la diferencia con respecto al resto de los grupos. \* Diferencia estadísticamente significativa (p<0.01) comparado con el testigo negativo.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran un aumento en la frecuencia de micronúcleos de médula ósea de ratón expuestos por 72h a CEM de  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad generados en una subestación eléctrica y ese efecto se repite a las 240h. Es importante señalar que los tiempos de exposición fueron in-interrumpidos además de que los animales se colocaron totalmente junto al transformador.

Un estudio presentado por Scarfi y cols. (1999), reportan no encontrar efecto genotóxico de los campos electromagnéticos al exponer cultivos de linfocitos humanos entre 0.05 y 1.0 mT de intensidad magnética, en el presente trabajo si se encontró tal efecto, a la intensidad de 2.0 mT lograda en el laboratorio la cual se utilizó como testigo positivo.

Otros trabajos que ratifican esto son los reportados por otros autores tales como Nordenson y cols. (1984 y 1988), Shimizu y cols. (1991) y Simkó y cols. (1998) quienes informan que hay aumento en la frecuencia de micronúcleos; sin embargo cabe destacar que en todas las investigaciones mencionadas se utilizaron diferentes tipos celulares así como también diversos tipos de campo y de intensidades magnéticas.

En la literatura revisada hasta el momento, no se encontraron reportes de efecto genotóxico a intensidades tan bajas como la utilizada en el presente estudio, la intensidad menor reportada es de

75 o  $150\mu\text{T}$  a 32 HZ o a campos de  $140\mu\text{T}$  a 50 Hz, que fue utilizada por Tofani y cols. (1995), quienes utilizaron campos sinusoidales y pulsantes sobre cultivos de linfocitos de sangre periférica y no encontraron incremento significativo de células micronucleadas.

Por otro lado, Nordenson y cols. (1984 y 1988) reportan un aumento en la frecuencia de micronúcleos en trabajadores de líneas eléctricas en similitud con el presente trabajo y contrariamente a lo reportado por Valjus y cols. (1993) quienes no encontraron diferencias en la frecuencia de MN en trabajadores de líneas eléctricas, sin embargo si reporta rompimiento en cromátides lo cual se asume como efecto genotóxico de CEM.

Más recientemente, Abramson-Zetterberg y cols. (2001), no encontraron aumento en los niveles de eritrocitos micronucleados ni efectos en los cromosomas al exponer ratones a campos magnéticos de 50 HZ y  $14\mu\text{T}$  de intensidad durante 18 días. Ellos utilizaron la prueba de MN por citometría de flujo. En el presente trabajo se trabajó con la prueba de MN manual y si se encontró aumento en el número de células micronucleadas a  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad durante 10 días.

Por otro lado, en relación con los resultados obtenidos para las variables de células espermáticas, no se pudo demostrar efecto genotóxico provocado por campos electromagnéticos producidos en la subestación eléctrica mencionada. En el tratamiento agudo la prueba de AME no mostró ningún dato que pudiera indicar algún efecto

adverso, ya que los porcentajes de anomalías de la morfología espermática obtenidos en el grupo tratado no presentaron un incremento estadísticamente significativo en relación al testigo negativo y tomando en cuenta lo encontrado por diversos autores como Wyrobek (1979) y Tablado-Almela (1996) que señalan no encontrar ningún efecto, se puede asumir que el CEM producido en una subestación eléctrica ( $8.8\mu\text{T}$ ), no produce efecto alguno sobre la morfología de espermatozoides de ratón. Esto se corrobora una vez más con lo reportado por Elbetieha y cols. (2002) quienes no encontraron efecto en las células germinales de ratones expuestos a una intensidad de flujo magnético de  $\approx 0.25\mu\text{T}$  por 90 días, aunque es una intensidad menor a la utilizada en esta investigación. Esto último concuerda con los resultados obtenidos en el tratamiento crónico, en donde estadísticamente, no hubo diferencia significativa entre el grupo tratado y el testigo negativo.

Por otra parte, el recuento espermático del tratamiento agudo realizado en la presente investigación, mostró un incremento en el grupo tratado en comparación al testigo negativo, por el contrario Furuya y cols. reportan efecto adverso de CEM de 50 Hz y 1.0 mT en ratones al exponerlos durante 13, 26, 39 y 52 días, en la proliferación y diferenciación de espermatogonias durante la espermatogénesis. Por tanto es importante realizar mayores investigaciones sobre esta área ya que la intensidad utilizada en el presente estudio fue significativamente menor ( $8.8\mu\text{T}$ ) así como el periodo de exposición (10 días) y se hubiera podido esperar no encontrar ningún efecto.

Con respecto al incremento en el RE, existen trabajos que utilizaron otros tipos celulares, donde se informa que los CEM son capaces de inducir aumentos en la proliferación celular como el estudio hecho por Scarfi y cols. (1999) quienes encontraron aumento en la proliferación de linfocitos humanos expuestos a CEM de 0.05 a 1.0 mT por 72h. Asimismo, en un estudio hecho por nuestro equipo de trabajo, se encontró aumento en el índice proliferativo de linfocitos humanos expuestos in vitro a CEM de 60 Hz e intensidades de 1.0, 1.5 y 2.0 mT por 72h (Heredia-Rojas y cols. 2001).

Por otra parte, Shaw, (2001), ha realizado investigaciones bibliográficas sobre los efectos adversos entre reproducción en humanos, principalmente en mujeres, y la exposición a CEM, y no encontró evidencia suficiente para apoyar dicho planteamiento. Por lo tanto, propone realizar más investigaciones para poder llegar a una conclusión científica válida. Así, de alguna manera, el presente trabajo contribuye para apoyar la idea de realizar mayores investigaciones relacionadas con los problemas de reproducción y la exposición a CEM, ya que se encontró alteraciones en el recuento espermático realizado del tratamiento agudo. En vista de los resultados obtenidos en la presente investigación se recomienda realizar más estudios relacionados con esto, tratando de correlacionar las variables experimentales al máximo.

## CONCLUSIONES

1. La exposición a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad durante 72h y 240h produce un efecto genotóxico en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c, detectado mediante la prueba de micronúcleos.

2. La exposición a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad durante 72h y 240h no produce un efecto genotóxico en células espermáticas de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c, evaluado por alteraciones morfológicas del espermatozoide.

3. La exposición a campos electromagnéticos de 60 Hz de frecuencia y  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad durante 72h produce un incremento en células espermáticas de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c, evaluado mediante el recuento espermático, pero no así a las 240h de exposición

Aunque de este trabajo se han derivado conclusiones firmes, aún es necesario analizar otros procedimientos que nos permitan ver el efecto en una variedad de células que haga posible valorar la influencia de los campos electromagnéticos y llegar así a un consenso más amplio.

## LITERATURA CITADA

- Abramsson-Zetterberg, L; Grawe, J.(2001). Extended exposure of adult and fetal mice to 50 Hz magnetic field does not increase the incidence of micronuclei in erythrocytes. *Bioelectromagnetics*22:351-357.
- Blackman, CF; Benane, SG. and Elliot, DJ.(1988). Influence of electromagnetic field 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 Schimd, W.(1970), Chemische mutagenese beim sauger, das knochenmark deschinesischen hamsters als in vivo test system hematologische befunde mach behandlung mittenimon. *Human Genetik.* 2:34-54.
- Davis, JG.(1992). Health effects of low-frequency electric and magnetic fields. Oak Ridge Associated Universities.
- Elbetieha, A; AL-Akhras, Moh´d-Ali; Darmani, H.(2002). Long-term exposure of male and female mice to 50 Hz magnetic field: Effects of fertility. *Bioelectromagnetics* 23:168-172.
- Fajardo-Gutierrez, A; Garduno-Espinoza, J; Yamamoto-Kimura, L; Hernández-Hernández, M; Gómez-Delgado, A; Mejia-Cartagena, SA. and Martínez-García, MC.(1993). Residence

close to high-tension electric power lines and its association with leukemia in children. *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.* 59:32-8.

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

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

Furuya, H; Aikawa, H; Hagino, T; Yoshida, T; Sakabe, K.(1998). Flow cytometric of the effects of 50 Hz magnetic fields on mouse spermatogenesis. *Nippon Eiscigako Zasshi* 53(2):420-5.

Galar-Castelan, I.(1988). *Electricidad y Magnetismo para estudiantes de ciencias biológicas*. Ed. Limusa. 1ra. Edición. México. Pp.223-37; 225.

Heredia-Rojas, JA; Rodríguez De la Fuente, AO; Velazco-Campos, MR; Leal-Garza, CH; Rodríguez-Flores, LE and De la Fuente-Cortez, B.(2001). Cytological effects of 60 Hz magnetic fields on human lymphocytes in vitro: siste-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic rate. *Bioelectromagnetics.* 22:145-149.

- Hugenholtz, Ap; Bruce, WR.(1983). Radiation induction of mutations affecting sperm morphology in mice. *Mutation research* 107 (1) 177-85.
- Kato, M; Honma, K; Shigemitsu, T. and Siga, 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; Shigemitsy, 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.
- Konoplia, EF. ; Vereshchako, GG. ; Khodosovskaia, AM. ; Rybacov, VN. ; Artemenko, OV.(2002). Morphofunctional state of the rat male reproductive system after chronic low intensity irradiation at a dose of 1.0 Gy. *Radiats. Biol. Radioecol.* 42(2) :136-40.
- Leonard, A.(1973). Observations on meiotic chromosomes of the male mouse as a test of the potential mutagenicity of chemicals in mammals. A. Hollander (Ed.) *Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection.* Volume 3. Plenum. Press. New York – London. U.S.A.
- Liburdy, Rp.(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.

- Lorimore, Sa; Kowalczyk, A; Sanders, RD. and Wright, Eg.(1990). Lack of acute effects of 2.0 mT 50 Hz magnetic fields on murine hematopoiesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 58 (4):713-23.
- 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; Séller, 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. pp. 60.
- Morales-Matamoros, O.(1997). Campos Electrodomésticos y salud humana, Informe Instituto Costarricense de Electricidad (ICE). San José, Costa Rica.
- Nordenson, I; Mild, KH; Anderson, G. and Sandstrom, M.(1994). Chromosomal aberrations in human amniotic cells after

intermittent exposure to fifty Hertz magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 15 (4):293-01.

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

Pothakamury, UR; Barileta, 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, JI; 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.

Ramos-Alfano, G.(2000). Evaluación del potencial Genotóxico y Citotóxico de los Campos Electromagnéticos de 60 Hz sobre Eritrocitos de Médula Ósea de Ratón *Mus musculus* Línea BALB/c *in vivo*. Tesis Inédita. Fac. de Ciencias Biológicas, UANL. pp: 24-25.

Reese, JA; Jastes, RF. and Frazier, ME.(1998). 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. U.S.A.

- Scarfi, MR; Lioi, MB; Zeni, O; Della-Noce, M; Franceshi, C. and Bersani, F.(1999). Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz. sinusoidal magnetic field. *Health. Phys.* 76 (3): 244-50.
- Shaw, GM.(2001). Adverse human reproductive outcomes and electromagnetics fields: A brief summary of the epidemiologic literature. *Bioelectromagnetics Supplement* 5:S5-S18.
- Schimd, 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 electric transmission equipment: a retrospective cohort study. *International Journal of Epidemiology.* 22 (9): 1539-582.
- Segalen, J.(1989). Interpretation of sperm count. *Rev Fr Gynecol Obstet* 84(2):77-83.
- 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, infra-low frequency magnetic fields on bone marrow cell division. *Kosm. Biol. Aviakosm. Med.* 13 (6): 61-3.

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

**Tablado-Almela, L; Pérez-Sánchez, F; Núñez, J.(1998). Effect of exposure to static magnetic field on the morphology of mouse epididymal sperm. Bioelectromagnetics. 19: 377-383.**

**Thomson, RA; Michaelson, SM. and Nguyen, QA.(1988). Influence of 60 - Hertz magnetic field 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.**

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

**Vijayalaxmy-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-wide band electromagnetic radiation. *Int J. Radiat Biol.* 75 (1): 115-20.

Walleczek, J. and Budinger, TF.(1992). Pulsed magnetic field effect 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. *Am. J. of Epidemiology.* 109:273-84.

Wood, R.(1991). *Magnetismo. De la brújula a los Imanes Superconductores.* 1ra. Edición. McGraw-Hill. Capítulo 12: Biomagnetismo. pp: 165-73.

Wyrobeck, AJ; Heddler, JA; Bruce, WR.(1979). Chromosomal abnormalities and the morphology of mouse sperm heads. *Can J Genet Cytol* 17(4): 675-81.

Wyrobeck, AJ; Gordon, LA; Burkhart, JG; Francis, MW; Kapp, RW Jr; Malling, HB; Topham, JC; Whorton, MD.(1983). An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm test in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 115(1): 1-72.

Zar, JH. (1996). *Biostatistical análisis.* Tirad edition. Prentice-Hall Inc. Chapter 13:Data transformations.USA.pp:228-84.

# APÉNDICES

## APÉNDICE I

### *Solución fijadora para espermatozoides:*

Metanol absoluto	85 ml
Formaldehído	10 ml
Acido acético	5 ml

### *Buffer de fosfatos para RE : (PBS)*

#### **A**

NaCl	8 grs.
KCl	0.2 grs.
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 grs.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 grs.

#### **B**

CaCl	0.1 grs.
------	----------

#### **C**

MgCl <sub>2</sub>	0.1 grs.
-------------------	----------

Se disolvió cada uno por separado en 10 ml de agua destilada. Posteriormente se mezclan entre sí y se aforan en 70 ml de agua destilada para 100 ml de buffer. pH 7.4

***Buffer de fosfatos para MN:***

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                    0.852 grs.**

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                    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.**

***Eosina Y al 5%:***

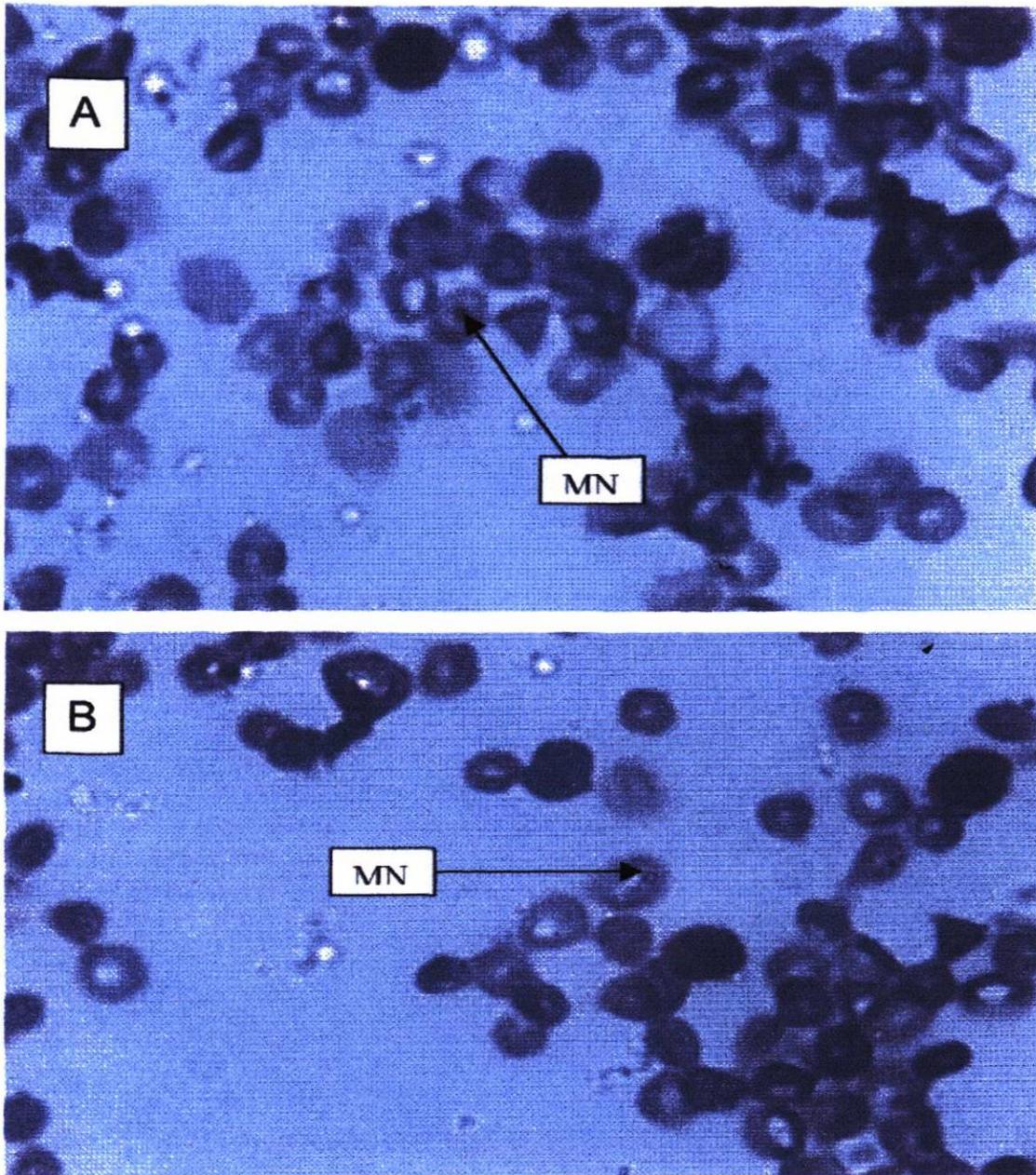
**Eosina Y                    5 ml**

**Agua destilada            95 ml**

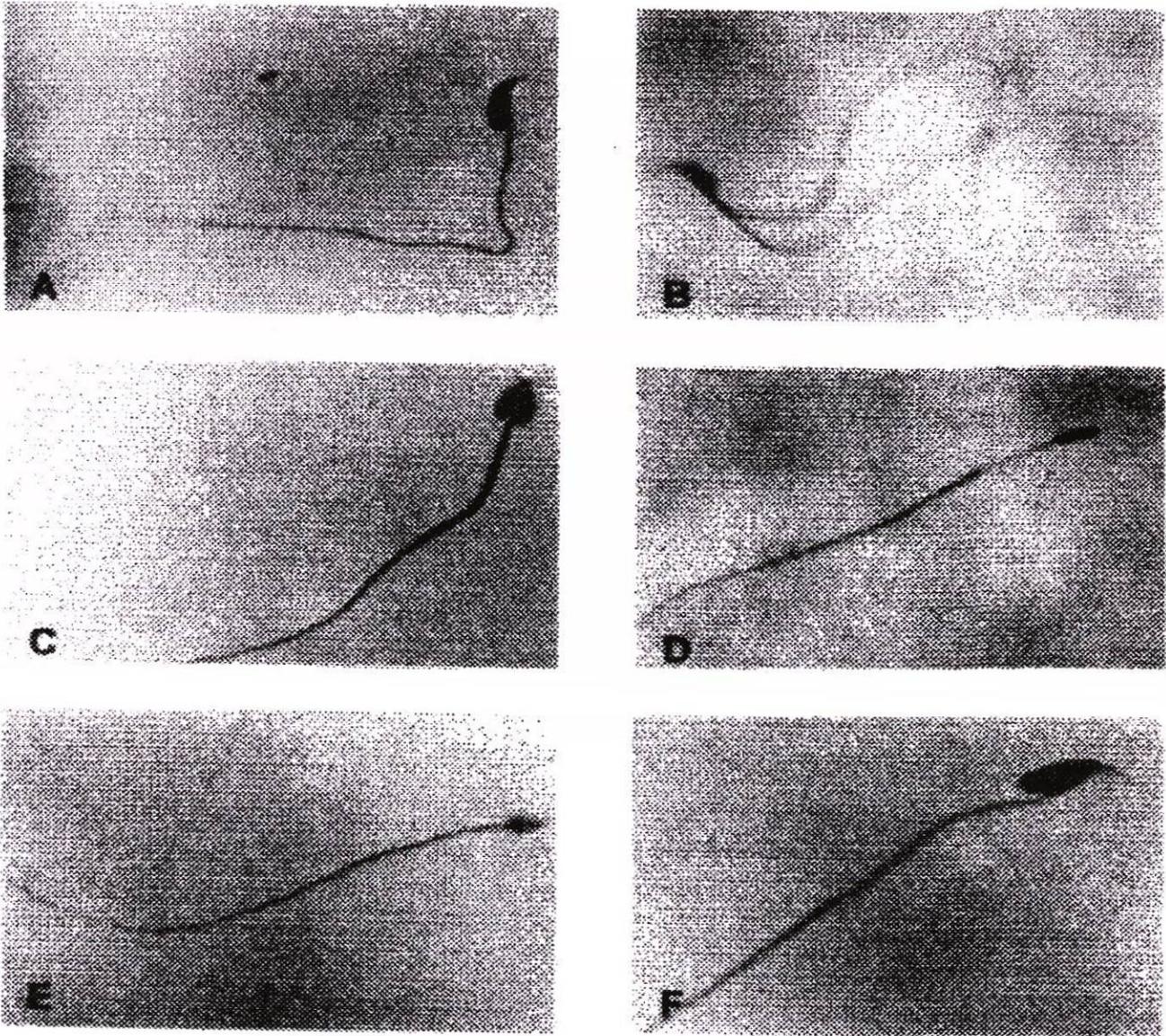
***Mitomicina C:***

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

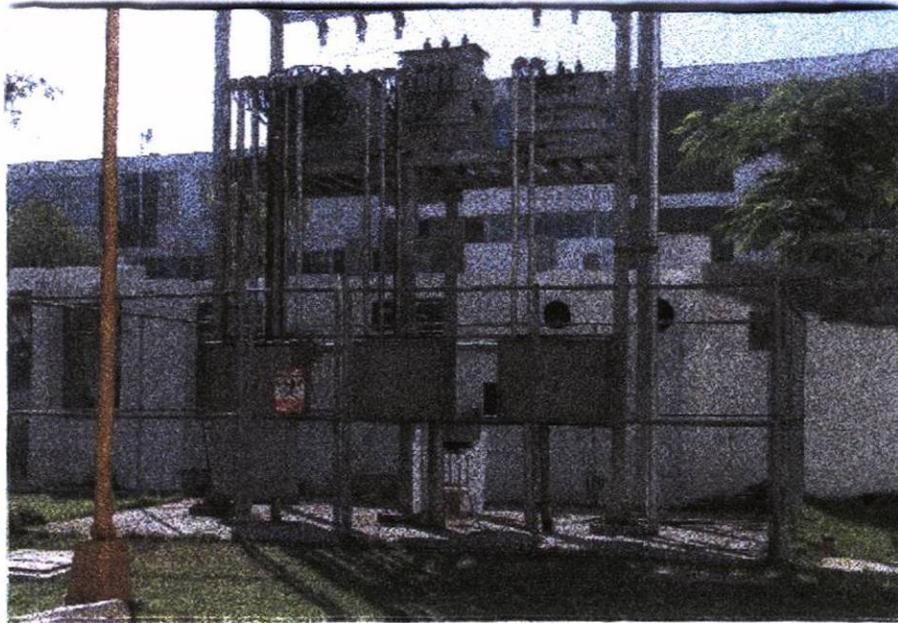
## APÉNDICE II



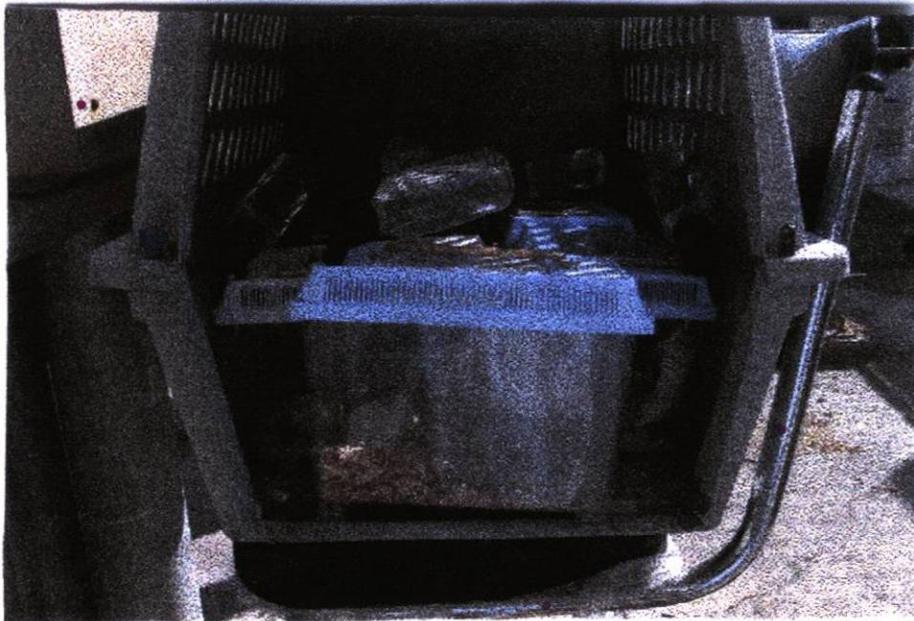
**FIGURA 1.** Microfotografía que muestra micronúcleos observados en eritrocitos de médula ósea de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c. En la letra A la flecha señala un MN opaco como normalmente se observan. En la letra B se señala un MN con refringencia, que es como se puede diferenciar de otros artefactos o cuerpos extraños (100X).



**FIGURA 2.** Espermatozoides de ratón *Mus musculus* Línea BALB/c, observados en el presente trabajo. A. Espermatozoide normal (cabeza en forma de garfio); B. Espermatozoide biflagelado; C. Espermatozoide bicéfalo; D. Espermatozoide filamentoso; E. Espermatozoide amorfo; F. Espermatozoide con gancho deforme.



**FIGURA 3.** Vista panorámica de la sub-estación eléctrica donde se llevó a cabo la investigación. Se aprecian tres transformadores de 150, 250 y 500 KVA respectivamente.



**FIGURA 4.** Grupo de animales expuestos al campo magnético de  $8.8\mu\text{T}$  en las líneas de conducción de la sub-estación eléctrica. El contenedor tenía seis jaulas, una para cada ratón. Un sistema igual fue colocado en la periferia de la sub-estación y se uso como testigo negativo.



**FIGURA 5.** Se colocó un contenedor de plástico que contenía las jaulas acrílicas de los ratones justo abajo del transformador y junto a las líneas de conducción. El valor estimado del campo magnético en esta zona fue de  $8.8\mu\text{T}$ .

### APÉNDICE III

<b>R</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo (-)</b>	<b>Testigo (+)</b>	<b>Testigo (+)</b>
			<b>CEM 2.0 mT</b>	<b>MMC</b>
1	9.33	8.33	17.00	20.00
2	8.67	7.67	15.00	20.33
3	9.33	7.00	17.67	19.67
4	10.67	8.33	15.00	19.67
5	11.67	8.33	16.00	22.00
6	11.00	7.00	14.67	18.33

**Tabla A.** Resultados originales de la **FMN** del experimento agudo (72h) a  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad magnética; cada valor representa el promedio de la lectura de 3 laminillas por animal para un total de 3000 células analizadas. R. Repetición

<b>R</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo (-)</b>
1	12.00	5.00
2	9.67	4.33
3	9.33	5.33
4	10.00	4.67
5	10.67	4.67
6	10.00	5.32

**Tabla B.** Resultados originales de la **FMN** del experimento crónico (240h) a  $8.8\mu\text{T}$  de intensidad magnética; cada valor representa el promedio de la lectura de 3 laminillas por animal para un total de 3000 células analizadas. R. Repetición.

<b>R</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo (-)</b>	<b>Testigo (+) CEM 2.0 mT</b>	<b>Testigo (+) MMC</b>
1	5	5	3	9
2	4	6	4	15
3	4	4	2	9
4	5	3	2	11
5	4	4	4	14
6	5	2	3	16

**Tabla C.** Resultados originales del porcentaje de AME del experimento agudo (72h) a 8.8 $\mu$ T de intensidad magnética. R. Repetición

<b>R</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo (-)</b>
1	5	7
2	4	7
3	3	7
4	5	6
5	4	4
6	5	4

**Tabla D.** Resultados originales del porcentaje de AME del experimento crónico (72h) a 8.8 $\mu$ T de intensidad magnética. R. repetición

<b>R</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo (-)</b>	<b>Testigo (+) CEM 2.0 mT</b>	<b>Testigo (+) MMC</b>
1	21.04x10 <sup>6</sup>	17.36x10 <sup>6</sup>	10.72x10 <sup>6</sup>	14.46x10 <sup>6</sup>
2	20.56x10 <sup>6</sup>	18.72x10 <sup>6</sup>	11.76x10 <sup>6</sup>	11.44x10 <sup>6</sup>
3	18.88x10 <sup>6</sup>	15.28x10 <sup>6</sup>	11.12x10 <sup>6</sup>	12.64x10 <sup>6</sup>
4	20.32x10 <sup>6</sup>	17.53x10 <sup>6</sup>	10.42x10 <sup>6</sup>	12.74x10 <sup>6</sup>
5	19.36x10 <sup>6</sup>	16.04x10 <sup>6</sup>	9.71x10 <sup>6</sup>	11.14x10 <sup>6</sup>
6	20.32x10 <sup>6</sup>	18.92x10 <sup>6</sup>	10.17x10 <sup>6</sup>	12.11x10 <sup>6</sup>

Tabla E. Resultados originales del RE del experimento agudo (72h) a 8.8μT de intensidad magnética. R. Repetición

<b>R</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Testigo (-)</b>
1	22.40x10 <sup>6</sup>	18.96x10 <sup>6</sup>
2	19.68x10 <sup>6</sup>	19.20x10 <sup>6</sup>
3	19.20x10 <sup>6</sup>	18.88x10 <sup>6</sup>
4	18.72x10 <sup>6</sup>	19.68x10 <sup>6</sup>
5	19.52x10 <sup>6</sup>	18.08x10 <sup>6</sup>
6	19.76x10 <sup>6</sup>	19.44x10 <sup>6</sup>

Tabla F. Resultados originales del RE del experimento crónico (240h) a 8.8μT de intensidad magnética. R. Repetición

