

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA *in vivo* DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE BAJA FRECUENCIA (CM-ELF) SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE RATONES (*Mus musculus*).”

Tesis presentada por la Bachiller:

Hito Cabana, Kelly Jimena

Para optar el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:

Dra. Milagro Terán Dianderas

Co- asesora:

Dra. Martha Valdivia Cuya

AREQUIPA – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000045484

N° Trámite en Fac. 362-2017

Fecha Recep. Fac. 03-10-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **HITO CABANA, Kelly Jimena**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICION CRONICA in vivo DE CAMPOS MAGNETICOS DE BAJA FRECUENCIA (CM-ELF) SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE RATONES MACHO"

DICTAMINADORES: **Dr. Jaime Cárdenas García** 2) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS:

(Devolver antes de 8 días hábiles)

FECHA

28/12/17

ASESOR: **Mgter. Milagro Terán Dianderas**

DICTAMEN ASESORÍA: Señora Decana de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION DEL EFECTO DE LA EXPOSICION CRONICA in vivo DE CAMPOS MAGNETICOS DE BAJA FRECUENCIA (CM-ELF) SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ACROSINA EN ESPERMATOZOIDES DE RATONES (Mus musculus)"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

FIRMA

FECHA

17.10.2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dra. Gaby Velasco Lozano**
- 2) **Dr. Jaime Cárdenas García**

- 3) **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

(Devolver antes de 15 días hábiles)

FECHA

31.10.2018

JURADOS: PRESIDENTE

Dra. Gaby Velasco Lozano

VOCAL

Dr. Jaime Cárdenas García

SECRETARIO

Ing. Cinthia Córdova Barrios

FECHA 14/11/2018

HORA 19:00 hs

LOCAL SOM FACULTAD

FIRMA DEL DECANO

FECHA

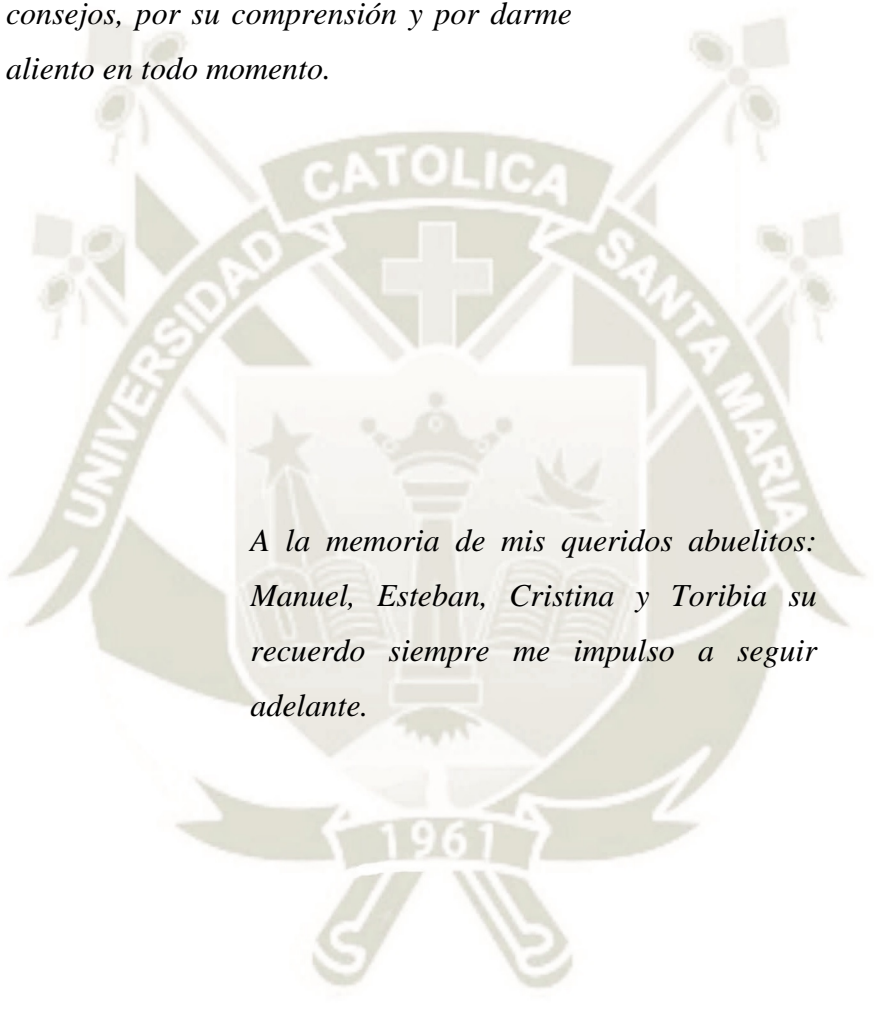
07/11/2018

*En especial a Dios, por guiarme en la vida,
por llenar mi camino con excelentes
personas, por darme una familia llena de
amor y amigos.*



*A mi Padre Edgard y a mi Madre Nancy por
darme siempre su apoyo, su dedicación, su
amor, sacrificio, confianza y consejos para
seguir con mi carrera e incentivarme día a
día. Por ustedes seguiré adelante hacia mis
metas y sueños, son la razón de mi vida.*

A mi tía Edith, mi tío José, mis primas Mariana e Ivonne, mi primo José Luis, mi sobrino José Ignacio por su apoyo, por sus consejos, por su comprensión y por darme aliento en todo momento.



A la memoria de mis queridos abuelitos: Manuel, Esteban, Cristina y Toribia su recuerdo siempre me impulso a seguir adelante.

A mis tíos Yvan, Hermila, Ysabel, Beatriz, Jorge, Janet, Víctor, Freddy por su amor incondicional, por siempre confiar en mí y su apoyo.

*A mis primos: Sergio, Leonardo y Valentín
por sus sonrisas y momentos vividos.*



*A mis amigas Dani, Ceci, Brenda, Carito,
Yuli por su amistad, por sus alientos y
compañía en valiosos momentos.*

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido desarrollado completamente en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, dirigido por la MsSc. Martha Valdivia Cuya a quien quiero agradecer por encaminarme a un mundo de ciencia, brindarme invaluable conocimientos, orientación y por darme la oportunidad de pertenecer a un maravilloso grupo de investigación.

A la MsSc. Patricia Woll de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por apoyarme, por su tiempo, por su dedicación y brindarme su laboratorio para el desarrollo del trabajo.

A Naysha Meza Elguera, mi amiga, quien a mi lado supo apoyarme en todo el desarrollo del trabajo, sabe escuchar, sabe alentarme a seguir adelante y sabe alegrarse por cada uno de mis pequeños éxitos.

A mis queridos amigos del Laboratorio de Fisiología de la reproducción (LFR): Lourdes, Héctor, Christian, Zezé, Erik, Tania, Paty, Mapi, Cathy, Jacky quienes dedicaron su valioso tiempo en apoyo con mi trabajo, por los buenos momentos que vivimos y su cariño incondicional.

A la Dra. Milagro Terán Dianderas, por su apoyo, comprensión y orientación del presente trabajo.

A la Ing. Cinthia Córdova Barrios, al Dr. Jaime Cárdenas García y Dra. Gaby Velasco Lozano por su apoyo y acertadas correcciones en la orientación del presente trabajo.

A la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, mi alma mater, por la formación profesional en mi educación universitaria.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. El acrosoma.....	5
1.2. Reacción del acrosoma (RA).....	6
1.3. Acrosina.....	10
1.4. Evaluación de la actividad proteolítica de espermatozoides.....	10
1.5. Campos electromagnéticos, radiaciones ionizantes y radiaciones no ionizantes	
11	
Radiación No Ionizante.....	15
Radiaciones Ionizantes.....	16
1.6. Campos magnéticos.....	17
1.7. Efecto de los Campos magnéticos y su efecto en la salud reproductiva.....	18
CAPÍTULO II.....	21
2. MATERIALES Y METODOS.....	21
2.1. Materiales.....	21
2.1.1. Medios de cultivo.....	21
2.1.2. Soluciones.....	21
2.1.3. Reactivos.....	21
2.1.4. Material biológico.....	22
2.1.5. Material de plástico y vidrio.....	22

2.1.6.	Materiales del Bioterio.....	23
2.1.7.	Equipos.....	23
2.2.	Metodología	24
2.2.1.	Diseño e implementación de un sistema generador de campos magnéticos de baja frecuencia basados en bobinas de Helmholtz para ratones de prueba en estudios biológicos.....	24
2.2.2.	Exposición a campos magnéticos	25
2.2.3.	Procedimiento experimental	26
CAPÍTULO III.....		33
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1.	Resultados de los parámetros espermáticos: concentración, movilidad, vitalidad e integridad de membrana plasmática (Test de Host).....	33
3.1.1.	Concentración de espermatozoides	33
3.1.2.	Movilidad de espermatozoides	35
3.1.3.	Vitalidad de espermatozoides	36
3.1.4.	Integridad de membrana plasmática (Test de HOST)	38
3.2.	Medición de la actividad de acrosina mediante la digestión de gelatina en placa 40	
3.3.	Actividad enzimática de acrosina por la hidrólisis de éster de bajo peso molecular (BAEE) a través de espectrofotometría	47
CAPITULO IV		51
CONCLUSIONES.....		51
RECOMENDACIONES.....		52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		53
ANEXOS.....		65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Partes del espermatozoide: I. Cabeza, II. Cuello, III. Pieza media, IV. Pieza principal, V. Pieza final. 1) Membrana citoplasmática 2) Acrosoma 3) Membrana nuclear 4) Núcleo 5) Casquete posnuclear 6) Centriolo proximal 7) Filamento axial 8) Hélice mitocondrial 9) Envoltura fibrosa. (16)

Figura N° 2. Microfotografía de luz de la unión del espermatozoide de ratón a la zona pelúcida de un ovocito in vitro.(51)

Figura N° 3. Diagrama que ilustra la reacción acrosómica en el espermatozoide humano. I. espermatozoide con el acrosoma intacto. II. reacción del segmento principal: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP). III. reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV. reacción acrosómica del segmento principal y segmento ecuatorial. (40)

Figura N° 4. Procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra. 1) activación, 2) capacitación, 3) hiperactivación, 4) reconocimiento entre gametos, 5) reacción acrosomal, 6) adhesión y 7) fusión. (60)

Figura N° 5. Diagrama de un campo electromagnético (96).

Figura N° 6. Fuentes de exposición de campos electromagnéticos en la vida cotidiana (95).

Figura N° 7. Diagrama de un espectro electromagnético. Mostrando una radiación ionizante y una radiación no ionizante con su respectiva frecuencia (97).

Figura N° 8. Gráfica de una onda sinusoidal representando la longitud de onda, el periodo y la amplitud (97).

Figura N° 9. Sistema generador de campos magnéticos basados en bobinas de Helmholtz (109).

Figura N° 10. Exposición de los grupos de estudio: A. Grupo control, B. Grupo con exposición simulada, C. Grupo con exposición a campo magnético de 50 μ T y D. Grupo con exposición a campo magnético de 550 μ T.

Figura N° 11. Flujograma de los grupos de estudio.

Figura N° 12. Metodología del aislamiento de espermatozoides de ratón: A. sacrificio, B. disección de la cola del epidídimo, C. aislamiento del epidídimo en medio de cultivo BWW y D. incubación 37 °C con 5 % de CO₂.

Figura N° 13. Gráfica de las medias de la concentración de los grupos I, II, III y IV a los 35 días.

Figura N° 14. Gráfica de las medias de la concentración de los grupos I, II, III y IV a los 70 días.

Figura N° 15. Gráfica de las medias de la movilidad espermática de los grupos I, II, III y IV.

Figura N° 16. Gráfica de las medias de la movilidad espermática de los grupos I, II, III y IV.

Figura N° 17. Gráfica de las medias de la viabilidad de los grupos I, II, III y IV.

Figura N° 18. Gráfica de las medias de la viabilidad de los grupos I, II, III y IV.

Figura N° 19. Gráfica de las medias de la integridad de membrana de los grupos I, II, III y IV.

Figura N° 20. Gráfica de las medias de la integridad de membrana de los grupos I, II, III y IV.

Figura N° 21. Imágenes de halos de digestión en portaobjetos de espermatozoides, teñidos con Rojo Ponceau y obtenidas con el microscopio de luz (40 X y 20 X). Se observan espermatozoides con halos de digestión de diferentes diámetros, los cuales se pueden diferenciar en: grupo I (A), grupo II (B), grupo III (C) y grupo IV (D).

Figura N° 22. Imágenes de halos de digestión medidos con el programa Image J y obtenidas con el microscopio de luz a 40 X. Se observan espermatozoides con halos de digestión de diferentes diámetros, los cuales se pueden diferenciar en: grupo I (A), grupo II (B), grupo III (C) y grupo IV (D), donde cada columna pertenece a los dos periodos de tiempo, 35 y 70 días.

Figura N° 23. Promedio de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 35 días.

Figura N° 24. Promedio de la cantidad de espermatozoides con y sin halos de digestión sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 35 días.

Figura N° 25. Promedio de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 70 días.

Figura N° 26. Promedio de la cantidad de espermatozoides con y sin halos de digestión sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 70 días.

Figura N° 27. Actividad enzimática de acrosina de extractos de espermatozoides en dos tiempos de exposición 35 días, medida como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 micromol de BAEE en 1 minuto en cada tratamiento.

Figura N° 28. Actividad enzimática de acrosina de extractos de espermatozoides en dos tiempos de exposición 70 días, medida como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 micromol de BAEE en 1 minuto en cada tratamiento.

Figura N° 29. Vitalidad de los espermatozoides. Flechas naranjas señalan los espermatozoides vivos. Flecha negra señalan los espermatozoides muertos (40 X).

Figura N° 30. Integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Flechas naranjas señalan los espermatozoides vivos. Flecha negra señalan los espermatozoides muertos (40 X).

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

ANEXO 2. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA (HOST)

ANEXO 3. DATOS COMPLETOS DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

ANEXO 4. DATOS DE LA MEDIA Y LA DESVIACION ESTANDAR DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

ANEXO 5. DATOS DE LA MEDIA Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS HALOS DE DIGESTIÓN EN LOS GRUPOS I, II, III Y IV.

ANEXO 6. DATOS COMPLETOS DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR (BAEE).

ANEXO 7. DATOS DE LA MEDIA Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR (BAEE) EN LOS GRUPOS I, II, III Y IV.

ANEXO 8. DATOS ESTADÍSTICOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE DIGESTIÓN USANDO LA PRUEBA DE ANOVA

ANEXO 9. RESUMEN DE DATOS DE LOS GRUPOS II, III Y IV RESPECTO AL GRUPO I

ANEXO 10. RESUMEN DE DATOS DE LOS GRUPOS I, II, III Y IV DE LOS HALOS DE DIGESTIÓN

ANEXO 11. DATOS ESTADÍSTICOS DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO LA PRUEBA T SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES EN LOS GRUPOS I, II, III Y IV A LOS 35 DÍAS DE EXPOSICIÓN

ANEXO 12. DATOS ESTADÍSTICOS DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO LA PRUEBA T SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES EN LOS GRUPOS I, II, III Y IV A LOS 70 DÍAS DE EXPOSICIÓN

ANEXO 13. DATOS COMPLETOS DE LA CANTIDAD DE ESPERMATOZOIDES CON Y SIN HALOS DE DIGESTIÓN.

ANEXO 14. MARCO NORMATIVO NACIONAL

ANEXO 15. DERECHOS CONSTITUCIONALES DEL MEDIO AMBIENTE

ANEXO 16. MARCO NORMATIVO DE LOS NIVELES DE EXPOSICIÓN DE RADIACIÓN IONIZANTE.

ANEXO 17. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ROJO PONCEAU 0.1 %



ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BAEE: Benzoil Arginina Etil Éster

BSA: Albúmina sérica bovina

BWW: Medio Biggers, Whitten and Whittingham

CEM: Campo Electromagnético

CM: Campo Magnético

CM-ELF: Campos Magnéticos de Baja Frecuencia

CLU: Gen de la Clusterina

EAs: Extractos ácidos del acrosoma

HOST: Test Hiposmótica

IARC: Agencia Internacional de Investigación Contra el Cáncer

ICNIRP: Comisión Internacional de Protección contra la Radiación no Ionizante

IEEE: Instituto de Ingenieros Eléctricos y Electrónicos

MAE: Membrana Acrosomal Externa

MP: Membrana Plasmática

OIT: Organización Internacional del Trabajo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONG: Organización No Gubernamental

OSIPTEL: Organismo Supervisor de la Inversión Privada en Telecomunicaciones

PBS: Phosphate Buffered Saline, Buffer Fosfato Salino

RA: Reacción Acrosómica

RF-EMF: Campo electromagnético de Radiofrecuencia

RI: Radiación Ionizante

RNI: Radiación No Ionizante

ROS: Especie Oxígeno Reactivo o Radicales libres de oxígeno

SE: Segmento Ecuatorial

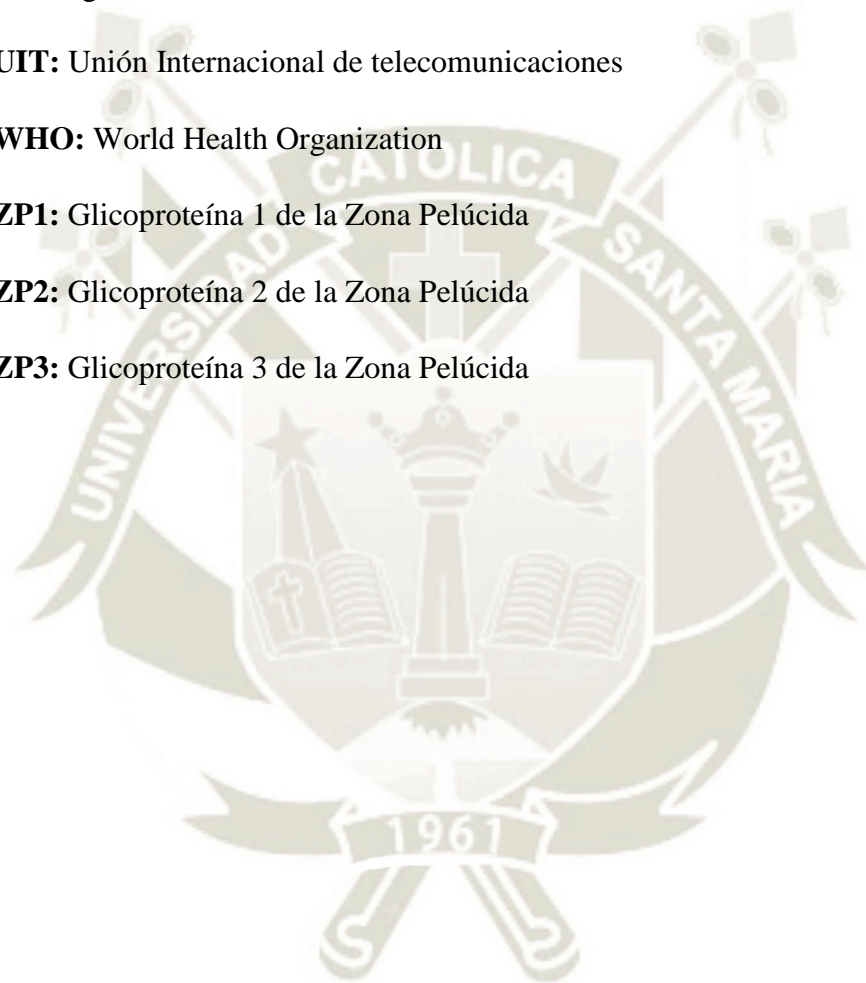
UIT: Unión Internacional de telecomunicaciones

WHO: World Health Organization

ZP1: Glicoproteína 1 de la Zona Pelúcida

ZP2: Glicoproteína 2 de la Zona Pelúcida

ZP3: Glicoproteína 3 de la Zona Pelúcida





RESUMEN

En los últimos años se ha venido incrementando la producción de aparatos tecnológicos, siendo fuente de campos electromagnéticos, conformados por campos magnéticos y campos eléctricos, encontrándose omnipresentes en nuestro entorno, causando posibles efectos dañinos sobre la salud reproductiva en humanos y animales.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia en la actividad enzimática de acrosina que se encuentra situada en el acrosoma del espermatozoide.

Se realizó la colecta de la muestra de espermatozoides de las colas de los epidídimos y se trabajó con dos metodologías para evaluar la actividad de acrosina: digestión de gelatina donde se midió el diámetro del halo formado en la cabeza de cada espermatozoide y la hidrólisis de éster de bajo peso molecular (BAEE) donde se midió la absorbancia de las muestras por espectrofotometría. Se trabajaron con dos periodos de tiempo 35 y 70 días, cada periodo conformado por cuatro grupos de trabajo, por un periodo de 35 días, Grupo I: 2 ratones control, Grupo II: 2 ratones con exposición simulada (Sham exposure), Grupo III: 2 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 50 μ T, Grupo IV: 2 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 550 μ T; y por un periodo de 70 días, Grupo I: 2 ratones control, Grupo II: 2 ratones con exposición simulada (Sham exposure), Grupo III: 3 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 50 μ T, Grupo IV: 3 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 550 μ T.

Los resultados obtenidos de los diámetros de halos (media $\mu\text{m} \pm$ desviación estándar) en la digestión de gelatina a los 35 días hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) entre el grupo I ($16,76 \pm 3,19$) con el grupo II ($9,76 \pm 2,13$), III ($5,29 \pm 2,57$) y IV ($10,36 \pm 5,05$). Mientras que a los 70 días no hubo una disminución significativa ($p > 0,05$) entre el grupo I ($8,93 \pm 1,80$) con el grupo II ($9,15 \pm 1,85$), III ($12,73 \pm 3,39$) y IV ($10,22 \pm 1,87$).

En la hidrólisis de éster de bajo peso molecular (BAEE) (media $\mu\text{mol BAEE}/\text{min}/\text{mg} \pm$ desviación estándar) a los 35 días no se observó una disminución significativa ($p > 0,05$) entre el grupo I ($0,71 \pm 0,29$) con el grupo II ($0,53 \pm 0,26$), III ($0,23 \pm 0,06$) y IV ($0,36 \pm 0,24$). Sin embargo, a los 70 días no se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) entre el grupo I ($0,35 \pm 0,09$) con el grupo II ($1,64 \pm 0,29$), III ($0,43 \pm 0,10$) y IV ($0,85 \pm 0,02$); pero si se observó una disminución significativa entre el grupo II con el grupo III y grupo IV.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que los ratones expuestos a mayor dosis de campos magnéticos de baja frecuencia afectan la actividad enzimática de la acrosina.

Palabras clave: *actividad proteolítica, acrosina, campos magnéticos de baja frecuencia, reproducción.*

ABSTRACT

In recent years the production of technological devices has been increasing as a source of electromagnetic fields shaped by magnetic fields and electric fields, being ubiquitous in our environment causing possible harmful effects on human and animal reproductive health.

The objective of the present study was to evaluate the effect of low frequency magnetic fields on the enzymatic activity of acrosin that is located in the sperm acrosome.

The collection of the sperm sample from the tails of the epididymis was carried out and two methodologies were used to evaluate the activity of acrosine: gelatin digestion where measured the diameter of the halo formed in the head of each spermatozoon and the ester hydrolysis were measured of low molecular weight (BAEE) where the absorbance of the samples was measured by spectrophotometry. We worked with two periods of time 35 and 70 days, each period consisting of four work groups, for a period of 35 days, Group I: 2 control mice, Group II: 2 mice with simulated exposure (Sham exposure), Group III : 2 mice with exposure to magnetic fields of 50 Hz, 50 μ T, Group IV: 2 mice with exposure to magnetic fields of 50 Hz, 550 μ T; and for a period of 70 days, Group I: 2 control mice, Group II: 2 mice with sham exposure, Group III: 3 mice with magnetic field exposure of 50 Hz, 50 μ T, Group IV: 3 mice with exposure to magnetic fields of 50 Hz, 550 μ T.

The results of halos diameters (mean μ m \pm standard deviation) in gelatin digestion at 35 days showed a significant decrease ($p < 0.05$) between group I (16.76 ± 3.19) with the group II (9.76 ± 2.13), III (5.29 ± 2.57) and IV (10.36 ± 5.05). While at 70 days there was no significant decrease ($p > 0.05$) between group I (8.93 ± 1.80) with group II (9.15 ± 1.85), III (12.73 ± 3.39) and IV (10.22 ± 1.87).

In the hydrolysis of low molecular weight ester (BAEE) (mean μ mol BAEE / min / mg \pm standard deviation) at 35 days no significant decrease was observed ($p > 0.05$) between group I (0.71 ± 0.29) with group II (0.53 ± 0.26), III (0.23 ± 0.06) and IV (0.36 ± 0.24). However, at 70 days there was no significant decrease ($p < 0.05$) between group I (0.35 ± 0.09) and group II (1.64 ± 0.29), III (0.43 ± 0.10) and IV (0.85 ± 0.02); but if there is a significant decrease in group II with group III and group IV.

With the results obtained it can be concluded that mice exposed to higher doses of low frequency magnetic fields affect the enzymatic activity of acrosin.

Keywords: *proteolytic activity, acrosine, low frequency magnetic fields, reproduction.*



INTRODUCCIÓN

Las investigaciones científicas en los campos magnéticos han ido incrementando, ya que son un debate público acerca de posibles efectos adversos sobre la salud humana. Las redes eléctricas originan campos magnéticos que interaccionan diariamente con el cuerpo humano. En el ambiente los campos magnéticos dan lugar a campos eléctricos inducidos en un sistema biológico (1).

Los campos electromagnéticos pueden separarse de su fuente y viajar a largas distancias, esta propiedad se usa para transmitir información como por ejemplo transmisión, comunicación móvil, televisión y datos inalámbricos a los que estamos expuestos diariamente en la vida cotidiana y están relacionados con problemas reproductivos. No se pone en cuestión el hecho que por encima de ciertos umbrales de los campos electromagnéticos puede desencadenar efectos biológicos. La polémica se encuentra en si los campos electromagnéticos de bajos niveles de exposición a largo plazo pueden provocar alguna respuesta biológica e influir en la salud de la persona (2).

En la vida cotidiana, las personas están expuestas a campos de baja frecuencia alrededor de aparatos eléctricos y dispositivos electrónicos, principalmente en el hogar y en el trabajo. Las líneas eléctricas también son una fuente de campos de baja frecuencia (2).

Los efectos estudiados sobre los campos electromagnéticos de baja intensidad en el hogar fueron dolores de cabeza, náuseas, ansiedad, suicidios y depresiones, fatiga y pérdida de libido. Se ha informado de casos de irritación ocular general y cataratas en trabajadores expuestos a niveles altos de radiación de radiofrecuencia (RF) y microondas. Incluso existe un pequeño incremento de leucemia infantil asociados a la exposición de campos magnéticos (3).

La reacción del acrosoma (RA) es un evento secretorio que consiste de fusiones entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática que cubre el acrosoma resultando en la vesiculación de estas membranas y la dispersión de la matriz

acrosomal (4). Durante este proceso la proacrosina es activada en acrosina, siendo esta conversión importante para la unión y penetración a la zona pelúcida (5,6).

Los espermatozoides que no tienen RA o que ocurrió antes de encontrarse con el ovocito no pueden penetrar la zona pelúcida. Una fecundación exitosa depende, entre otras cosas, de la capacidad que tengan los espermatozoides de experimentar la reacción acrosómica (4).

En estudios previos se evaluó el uso de los teléfonos celulares que emiten campos electromagnéticos de radiofrecuencia (RF-EMF), ya que ha formado parte de la vida diaria. Para el estudio se evaluó el efecto de los RF-EMF sobre la movilidad espermática, la fragmentación del ADN espermático, la expresión del gen de la clusterina seminal (CLU) y la actividad de acrosina del espermatozoide. Obteniéndose como resultado una disminución significativa en la movilidad del espermatozoide y la actividad de acrosina, pero hubo un aumento en la fragmentación del ADN espermático, en la expresión génica del CLU y los niveles de proteína del CLU (7).

Existen daños induciendo a una apoptosis de las células espermáticas en ratones (8,9), disminución de hormonas sexuales, masa testicular, cantidad y movilidad de espermatozoides y población de células germinales, mientras aumenta niveles de testosterona y masas testiculares en estudios con animales (10-13).

Actualmente no existe en la literatura trabajos previos de exposición a campos magnéticos de baja frecuencia de 550 μ T y 50 μ T en donde se concluya el efecto sobre la actividad enzimática de acrosina.

El presente trabajo de investigación pretende demostrar si los campos magnéticos de baja frecuencia de 550 μ T y 50 μ T afectan negativamente la actividad enzimática de la acrosina a dos diferentes periodos de exposición 35 y 70 días.

HIPÓTESIS

Dado que los organismos vivos son conductores eléctricos de campos magnéticos de baja frecuencia, es posible que las ondas magnéticas de extremadamente baja frecuencia (CM-ELF), afectan negativamente la actividad enzimática de acrosina de los espermatozoides.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la exposición crónica *in vivo* de campos magnéticos de baja frecuencia (CM-ELF) sobre la actividad enzimática de acrosina en espermatozoides de ratones (*Mus musculus*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de los campos magnéticos de baja frecuencia en los parámetros espermáticos.
2. Estandarizar un protocolo para la identificación de actividad enzimática individual en espermatozoides por halos de digestión en gelatina.
3. Evaluar el efecto del tiempo de exposición de campos magnéticos de baja frecuencia en la actividad proteolítica de extractos ácidos acrosomales por hidrólisis de éster de bajo peso molecular (BAEE).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. El acrosoma

El acrosoma es una organela espermática con forma de capucha situada en el extremo apical del espermatozoide (13) como muestra la Figura 1, su tamaño y forma varía de acuerdo a la especie (15), está compuesto de la membrana acrosomal externa e interna. Estas dos membranas están unidas por puentes, que mantienen cierto espacio entre ambas membranas, el acrosoma es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y porción anterior de la cabeza del espermatozoide (16). Deriva del aparato de Golgi (15,17-19) y la formación del acrosoma comienza con la espermatogénesis con la diferenciación de espermatidas (18), la espermatogénesis se puede dividir en cuatro etapas: golgi, capa, acrosoma, maduración, la duración de espermatogénesis varía entre diferentes especies (20).

El acrosoma es un saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo (21) contiene enzimas como la acrosina, hialuronidasa (22) y otras enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de fecundación (22).

El acrosoma juega un rol importante en el sitio de unión espermática - zona pelúcida durante el proceso de fertilización (17,19).



Figura 1. Partes del espermatozoide: I. Cabeza, II. Cuello, III. Pieza media, IV. Pieza principal, V. Pieza final. 1) Membrana citoplasmática 2) Acrosoma 3) Membrana nuclear 4) Núcleo 5) Casquete posnuclear 6) Centriolo proximal 7) Filamento axial 8) Hélice mitocondrial 9) Envoltura fibrosa. (16)

Todos los espermatozoides de mamíferos estudiados hasta el momento, fueron el hámster (23), conejo (24), jabalí (24,25), carnero (22), toro (26), y hombre (26,28).

1.2. Reacción del acrosoma (RA)

El primer contacto entre el óvulo y el espermatozoide se realiza a través de la zona pelúcida como muestra la microfotografía de luz de la Figura 2, por un sistema de receptores sobre la zona pelúcida y sobre la superficie del espermatozoide, luego que ha ocurrido la fijación del espermatozoide sufre la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida, donde se van a liberar enzimas hidrolíticas del acrosoma ubicado en la cabeza del espermatozoide (5,6).

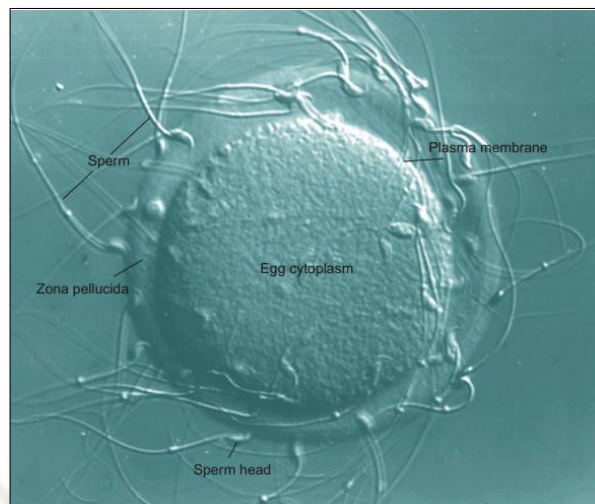


Figura 2. Microfotografía de luz de la unión del espermatozoide de ratón a la zona pelúcida de un ovocito in vitro.(51)

Durante el proceso de fertilización, donde el espermatozoide penetra la zona pelúcida induce a la RA y lograr una fertilización exitosa (5).

La reacción del acrosoma es la rotura y fusión progresiva de la membrana citoplasmática con la membrana acrosómica externa del espermatozoide, que da lugar a la liberación del contenido acrosomal, y así exponiendo la membrana acrosomal interna (29), debe ocurrir antes de penetrar la capa extracelular del ovocito (14) como muestra el diagrama de la Figura 3 ilustrando los pasos de la RA. Estudios recientes demuestran que el acrosoma contiene una variedad de enzimas hidrolíticas, pero está organizado en subdominios funcionales por proteínas estructurales no enzimáticas (30). Pero no todas las enzimas presentes en el acrosoma son hidrolíticas, la proteína principal es la acrosina con una actividad tipo tripsina, la actividad de la matriz extracelular alrededor del ovocito, como el ácido hialurónico cuyo rol es la unión con la zona pelúcida (31,32).

Los espermatozoides de varias especies de animales incluyendo humanos deben someterse a un proceso excitotónico dependiente del Ca^{2+} conocido como reacción acrosómica antes de la fertilización del ovocito (6, 33, 34), el aumento de concentraciones de Ca^{2+} es importante ya que va a desencadenar una cascada de eventos que involucra la RA (35, 36) y un aumento de pH, ocurre una disminución del colesterol y fosfolípidos que va a permitir la entrada del Ca^{2+} extracelular en la

membrana plasmática es un prerequisite para que ocurra la fusión de membranas en la RA (37,38). La zona pelúcida induce a la reacción acrosómica que permite al espermatozoide penetrar la zona pelúcida (5).

Estudios clínicos identificaron distintos grupos de hombres cuya fertilidad está asociada con una reacción acrosómica anormal (39).

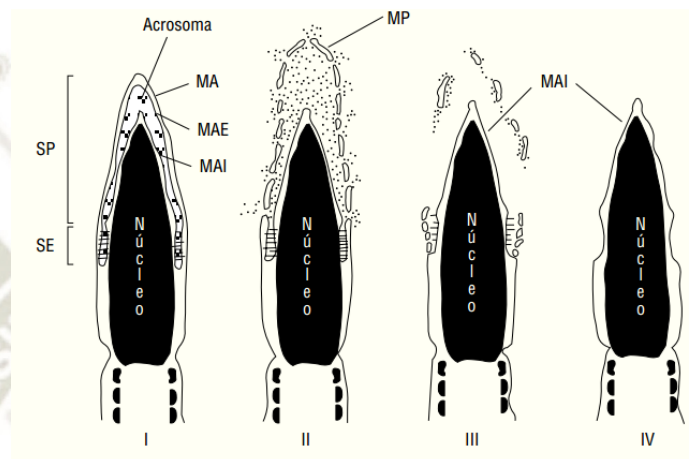


Figura 3. Diagrama que ilustra la reacción acrosómica en el espermatozoide humano. I. espermatozoide con el acrosoma intacto. II. reacción del segmento principal: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP). III. reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV. reacción acrosómica del segmento principal y segmento ecuatorial. (40)

El tiempo que demora el espermatozoide en experimentar la RA varía de acuerdo a la especie y las condiciones de incubación (33).

En la mayoría de mamíferos son reconocidas tres glicoproteínas en la zona pelúcida estas son ZP1, ZP2 y ZP3 que están cercamente relacionadas (41,42). En ratones son reconocidas tres proteínas como los componentes estructurales en la zona pelúcida, nombradas como ZP1, ZP2 y ZP3 (42). Cada una de esas proteínas consiste en un único polipéptido y son heterogéneamente glicosiladas con complejos del tipo asparagina N-Linked y serina/treonina-O-linked (44). Pero la ZP2 y la ZP3 juegan roles muy importantes (45,46). Para penetrar la zona pelúcida, el acrosoma del espermatozoide intacto reconoce y se une a una única cadena de O-linked oligosacáridos, que tal vez sea la ZP3 la cual sirve como receptor primario, es responsable de la unión del espermatozoide con el acrosoma intacto a la zona pelúcida

(45-52) y es el responsable de iniciar la reacción acrosómica. ZP2 es el receptor secundario que se une al acrosoma reaccionado del espermatozoide (45). Se argumenta que la ZP2 en lugar de la unión del espermatozoide a un solo ligando, la unión de espermatozoides se apoya en una estructura tridimensional, este modelo se basó en el estado de división de la ZP2, haciendo la zona pelúcida más permisiva (ZP2 no cortada) o no permisiva (ZP2 cortada). Con los datos recientes se ha propuesto que si los espermatozoides se adhieren a la zona pelúcida es con una ZP2 intacta (53, 54). Los datos experimentales sugieren que la ZP2 se une y es el sustrato de la acrosina una serino proteasa localizada en el acrosoma (55, 56).

Una vez que los espermatozoides son depositados en el tracto genital femenino, los espermatozoides son atraídos al ovocito. La fecundación se da por lo menos en seis pasos, los cuales se dan en un orden como describe la Figura 4. **Paso 1:** la capacitación e hiperactivación, es definida como el tiempo que el espermatozoide debe residir en el tracto reproductor y las modificaciones en su motilidad adquiriendo un movimiento asimétrico y amplio del flagelo (40,57), **Paso 2:** un espermatozoide con el acrosoma intacto se unirá a la zona pelúcida del ovocito, **Paso 3:** una vez unido el espermatozoide a la ZP experimentara la reacción acrosómica, **Paso 4:** para penetrar la ZP e ingresar al espacio perivitelino, **Paso 5:** el espermatozoide se adhiere a la membrana plasmática del ovocito, **Paso 6:** finalmente el espermatozoide se fusiona con este último (51, 58, 59).

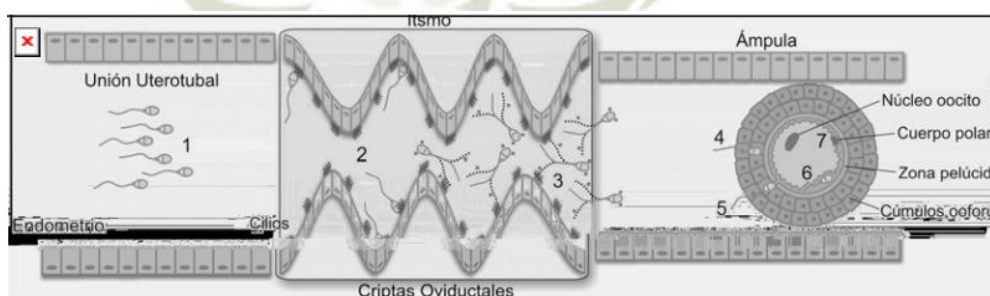


Figura 4. Procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra. 1) activación, 2) capacitación, 3) hiperactivación, 4) reconocimiento entre gametos, 5) reacción acrosomal, 6) adhesión y 7) fusión. (60)

1.3. Acrosina

La acrosina (EC 3.4.21.10) es una enzima tipo tripsina (serino proteasa) más estudiada asociada con el espermatozoide de mamíferos, se encuentra en la cabeza del espermatozoide tiene un proceso importante en la fertilización (61) ha tomado su importancia en el proceso indicador de la calidad espermática. La acrosina es liberada luego de la reacción acrosómica con propiedades de una serino proteasa (62).

Es una enzima responsable de la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida del óvulo durante la fecundación (62, 63, 64 y 83) y muestra una gran afinidad con la zona pelúcida (65), esto es demostrado en matriz acrosomal en bovinos, hámster, conejillos de india (61,66-70).

La presencia de la acrosina se ha demostrado en pollos (71), cerdo (26, 27), toro (27), conejillo de indias (72), carnero (27, 73), conejo (74), humano (75), perros (76).

En los espermatozoides de mamíferos estudiados, la acrosina presente un precursor enzimático en su forma zimógena es la proacrosina (77) inicialmente demostrado por Meizel en 1972 en conejos. La activación de proacrosina en acrosina requiere la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida y esta conversión ocurre en el proceso de capacitación (18, 78-81).

Según Maeda *et al* (82) en 1990, la actividad enzimática del acrosina puede medirse utilizando un portaobjetos de sustrato de gelatina, esta técnica es sencilla, reproducible y eficaz para evaluar algún tipo de daño a nivel enzimático del acrosina (82).

Polakoski y Zahler en 1977 (26) propusieron que la activación in vivo ocurre durante o resulta de la reacción acrosómica (26).

La proacrosina es la forma zimógena presente en la membrana interna del acrosoma del espermatozoide (61, 84), su forma activa es la acrosina siguiendo la capacidad de interacción del espermatozoide con glicoproteínas de la zona pelúcida (85, 86).

1.4. Evaluación de la actividad proteolítica de espermatozoides

La actividad proteolítica individual de los espermatozoides fue detectada usando como sustrato la gelatina. Esta técnica permite observar la reacción enzimática de un espermatozoide individual. Este método fue descrito anteriormente por Gaddum y Blandau en 1970 y 1972 (87, 88), quienes diseñaron un método para estudiar los

espermatozoides capaces de penetrar la zona pelúcida y demostrar su actividad proteolítica de la acrosina, usaron una mezcla de gelatina con tinta china. Fue modificada por Benitez-Bribiesca y Velazquez Meza en 1972, quienes eliminaron la tinta china del sistema (89). La ventaja de este método es que permite la observación minuciosa de las cabezas de espermatozoides individuales durante la liberación de la enzima (90).

La actividad de la acrosina es detectada por un halo alrededor de la cabeza de espermatozoides individuales. Los halos tienen tamaños variables, dependiendo del nivel de actividad de la acrosina y especie, hasta la fecha esta técnica ha sido usada con resultados satisfactorios en humanos (*Homo sapiens*), toro (*Bos taurus*), hámster (*Mesocricetus auratus*), perros (*Canis lupus*), ardilla macho (*Sciurus vulgaris*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), alpaca (*Vicugna pacos*) (91), conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (4), cobayo (*Cavia porcellus*), carnero (*Ovis canadensis*), perro (*Canis lupus*) (92-94), aves (82). Esta técnica es fácil y reproducible puede usarse para diagnosticar infertilidad debido a la disminución de la actividad de la acrosina, es una técnica eficiente para identificar la esterilidad masculina (85-86).

1.5. Campos electromagnéticos, radiaciones ionizantes y radiaciones no ionizantes

Los campos electromagnéticos (CEM) como muestra el diagrama de la Figura 5, se encuentran en forma omnipresente en el entorno del ser humano, por lo tanto, ha estado presente en la tierra. Los CEM están compuestos por campos magnéticos (como el producido por el giro del núcleo de hierro de la tierra) y campos eléctricos (como las tormentas), los cuales pueden separarse de su fuente y viajar por toda la habitación a grandes distancias con la velocidad de la luz (aproximadamente 300.000 kilómetros por segundo) como muestra la Tabla 1 de algunos aparatos electrónicos, esta propiedad se utiliza para transmitir información, donde tienen como fuente: artefactos electrodomésticos, computadoras, redes inalámbricas, instalaciones radio y televisión, teléfonos móviles, líneas de energía como muestra la Figura 6 (97). Cuando un CEM se encuentran con un objeto se puede dar tres efectos: a. puede ser reflejada, b. puede transmitirse a través del objeto, c. puede ser absorbida (125).

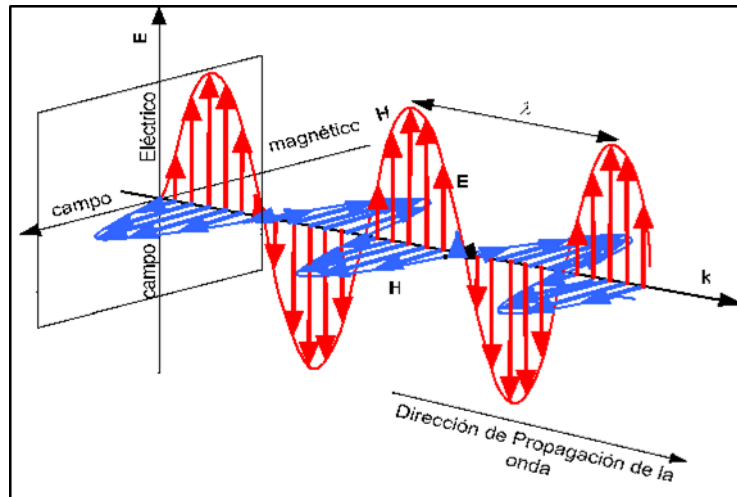


Figura 5. Diagrama de un campo electromagnético (96).

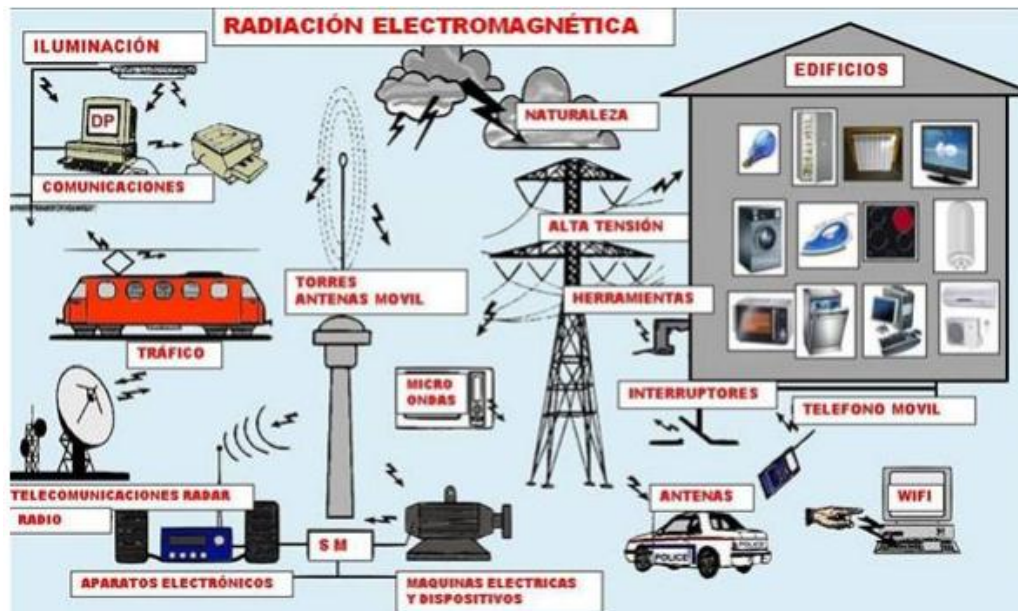


Figura 6. Fuentes de exposición de campos electromagnéticos en la vida cotidiana (95).

El espectro electromagnético se puede distinguir por diferentes rangos de acuerdo a su longitud de onda y su frecuencia como muestra el diagrama de la Figura 7. La radiación de onda electromagnética puede ser clasificada dos grupos: radiación ionizante y no ionizante (3).

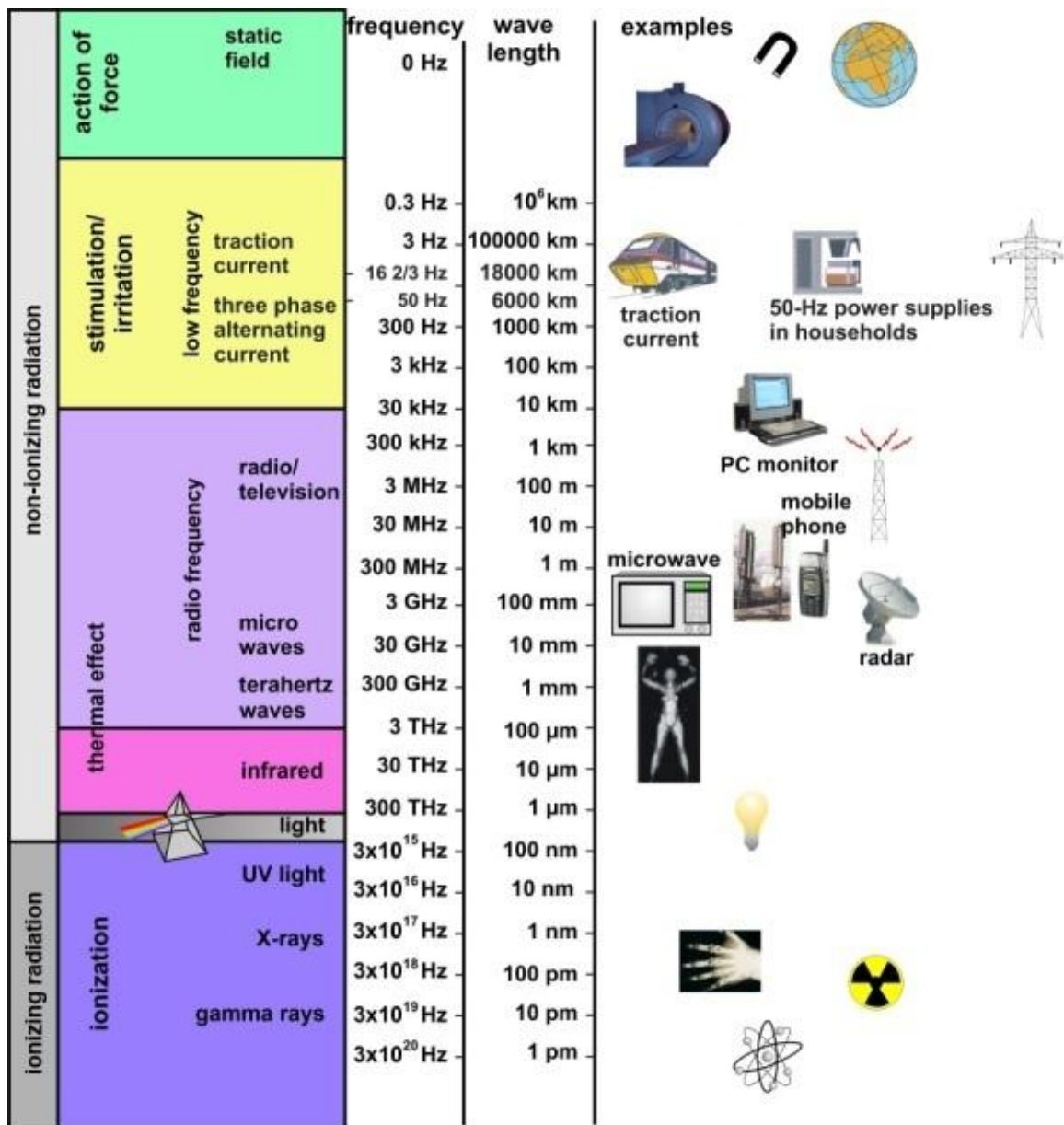


Figura 7. Diagrama de un espectro electromagnético. Mostrando una radiación ionizante y una radiación no ionizante con su respectiva frecuencia (97).

El campo eléctrico se mide en voltios por metro (V/m), aumenta el campo con mayor voltaje y disminuye con la distancia de la fuente (97).

El campo magnético se mide en amperios por metro (A/m) y se expresa como una densidad de flujo en tesla (T) o gauss (G) (97).

La frecuencia, se define como oscilaciones por segundo, expresada en Hercios(Hz) por ejemplo 1 Hz corresponde a una oscilación completa por segundo $1 \text{ Hz} = \frac{1}{s}$ (97).

La longitud de onda λ , se define como la longitud de una oscilación de una onda electromagnética (también llamado “periodo”), se expresa en metros (m) como muestra la gráfica de la Figura 8 (97).

La amplitud, se define como la altura de una oscilación como muestra la gráfica de la Figura 8. En el rango de campos electromagnéticos se clasifican de la siguiente forma (97):

- la intensidad del campo eléctrico (unidad V / m) para el campo eléctrico
- la intensidad del campo magnético (unidad A / m) o en la materia la densidad del flujo magnético (unidad T) para el campo magnético
- la densidad de flujo de potencia (unidad W/ m²) para el campo electromagnético.

El Hertz es la unidad de medida de la frecuencia de las ondas y corresponde a un ciclo por segundo como muestra la Ecuación 1 (125).

$$\lambda = v \cdot f \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde:

- λ = longitud de onda
- v = la velocidad de propagación que es igual a la velocidad luz (3×10^8 metros/segundo)
- f = frecuencia

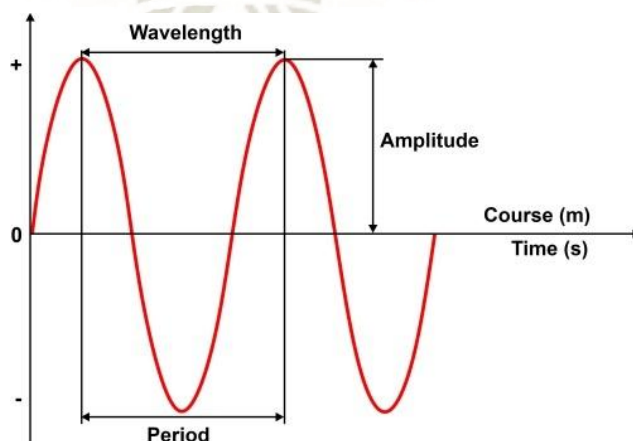


Figura 8. Gráfica de una onda sinusoidal representando la longitud de onda, el periodo y la amplitud (97).

Radiación No Ionizante

La radiación no ionizante (RNI), son de baja frecuencia y de ondas de longitud largas, su energía de los fotones no induce a la ionización de átomos y moléculas, es decir, no son capaces de romper enlaces que unen las moléculas para formar células, por ejemplo, la luz visible, la radiación infrarroja, radiación electromagnética de frecuencia extremadamente baja, estaciones base de telefonía celular (800-1900 MHz). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) las radiaciones no ionizantes del espectro electromagnético son agrupadas por su frecuencia (número de oscilación por segundo) y su longitud de onda (distancia entre dos picos de oscilación), comprenden campos estáticos o no variables con el tiempo 0 Hz (Herzio= un ciclo por segundo) hasta frecuencias de 300 GHz (3×10^{15} Hz), se clasifica de la siguiente forma (98):

Campos estáticos (0 Hz): Son campos que no cambian en dirección o intensidad en el tiempo (dispositivos de resonancia magnética) (98).

Campos de baja frecuencia 1 Hz - 300 Hz: Son campos eléctricos y magnéticos que varían en el tiempo. Está conformado por un campo eléctrico debido a una carga eléctrica y un campo magnético. (aparatos eléctricos, dispositivos electrónicos, líneas eléctricas, entre otros) (98).

Campos de frecuencia intermedia 300Hz-10MHz: Producen efectos térmicos e inducen a excitaciones nerviosas y musculares (transmisores de radio AM, sistemas antirrobo, sistemas de seguridad, pantallas de ordenador) (98).

Campos de alta frecuencia o radiofrecuencia 10 MHz-300 GHz: La exposición se mide en vatios por metro cuadrado (W/m^2). Ejerce cierto calentamiento sobre el tejido expuesto, puede causar cierta vibración sobre las moléculas del cuerpo humano y por lo tanto producir calor. Se utilizan en su mayoría con fines de comunicación (teléfonos móviles, Wi-fi, bluetooth, televisión, radios, estaciones base, dispositivos de seguridad, hornos microondas y en medicina como equipos de resonancia magnética) (98).

Radiaciones Ionizantes

Son de frecuencias muy altas y longitudes de onda muy cortas, los electrones son desplazados de las moléculas y los átomos; producidos por la interacción de fotones de muy alta energía como los rayos X, rayos gamma, rayos cósmicos, partículas alfa (126).

Con la preocupación pública acerca de los posibles efectos de los campos electromagnéticos (CEM) como líneas eléctricas o estaciones base de teléfonos móviles sobre si es un potencial impacto en la salud pública se requirió la participación de los organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la comisión internacional de protección contra la radiación no ionizante (ICNIRP), Instituto de ingenieros eléctricos y electrónicos (IEEE), la agencia internacional de investigación contra el cáncer (IARC) (2).

La OMS, en el año 1996 estableció un proyecto llamado “Proyecto Internacional sobre los Campos Electromagnéticos-CEM”, para evaluar las pruebas científicas acerca de la exposición de los CEM sobre la salud y el medio ambiente con una frecuencia de 0-300 GHz. El proyecto fue creado para obtener conocimiento acerca de estándares internacionalmente aceptables que limiten la exposición de los CEM (2).

La organización ICNIRP fue constituida como una comisión independiente, está reconocida como una Organización no gubernamental (ONG) colaboradora de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la organización internacional del trabajo (OIT). La ICNIRP está encargada de diseminar consejos basadas en la ciencia para limitar las exposiciones a la radiación no ionizante, basan su asesoramiento en publicaciones científicas sobre los efectos biológicos para todo rango de frecuencia de radiación no ionizante (RIN). Los valores aprobados por la ICNIRP como valores máximos de exposición son estándares internacionales aprobados por la OMS y la Unión Internacional de telecomunicaciones (UIT) (127).

A nivel nacional, en el Perú se establece un marco normativo que regula las radiaciones no ionizantes de los servicios de telecomunicaciones. Anexo 16

1.6. Campos magnéticos

El campo magnético surge de imanes permanentes, los imanes permanentes tienen un campo magnético estático (0 Hz) con una fuerza y dirección en gran medida constante (como el campo magnético de la tierra), se mide en amperios por metro (A/m) y se expresa como una densidad de flujo en tesla (T) y en el sistema cegesimal en gauss (G) para describir la fuerza de campo magnético en la materia (97).

La intensidad del campo magnético alrededor de un conductor aumenta con el aumento de la intensidad de corriente eléctrica y disminuye con la distancia de la fuente del campo (97).

Un campo magnético representada por la letra H y una densidad de flujo magnético asociada con la letra B existen solo si las cargas eléctricas se encuentran en movimiento, es decir si hay un flujo de corriente eléctrica. La relación entre las dos descripciones del campo B y H son importantes para la descripción de la interacción entre los campos y la materia biológica. Está representada por $B = \mu H$, donde $\mu = \mu_0$ representa a una constante de material biológico y μ_0 es la permeabilidad magnética del espacio libre (vacío, aire). Los campos magnéticos solo ejercen fuerzas sobre una carga en movimiento “ q ”. Dada por la fuerza de Lorentz como muestra la Ecuación 2 (3).

$$F = qv \times B \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde la dirección de la fuerza F es perpendicular a la velocidad v como a la densidad de flujo magnético B (3).

Los campos magnéticos aparecen cuando está en marcha un aparato electrónico y fluye la corriente, si esta encendido el aparato y circula la corriente estará presente un campo magnético proporcional a la intensidad de la corriente de la fuente que lo alimenta. Los materiales como las paredes no bloquean los campos magnéticos (ICNIRP) (127).

Tabla 1. Intensidades del campo eléctrico y magnético (μT) de algunos aparatos electrónicos a diversas distancias (125).

Aparato eléctrico	Intensidad del campo magnético (μT)			Intensidad del campo eléctrico (V/m) a 30 cm
	A una distancia de 3 cm (μT)	A una distancia de 30 cm (μT)	A una distancia de 1 m (μT)	
Secador de pelo	6 – 2000	0,01 – 7	0,01 – 0,03	80
Máquina de afeitar eléctrica	15 – 1500	0,08 – 9	0,01 – 0,03	
Aspiradora	200 – 800	2 – 20	0,13 – 2	50
Luz fluorescente	40 – 400	0,5 – 2	0,02 – 0,25	
Horno de microondas	73 – 200	4 – 8	0,25 – 0,6	
Radio portátil	16 – 56	1	< 0,01	
Horno eléctrico	1 – 50	0,15 – 0,5	0,01 – 0,04	8
Lavadora	0,8 – 50	0,15 – 3	0,01 – 0,15	
Plancha	8 – 30	0,12 – 0,3	0,01 – 0,03	120
Lavavajillas	3,5 – 20	0,6 – 3	0,07 – 0,3	
Ordenador	0,5 – 30	< 0,01		60
Frigorífico	0,5 – 1,7	0,01 – 0,25	<0,01	120
Televisor de color	2,5 - 50	0,04 – 2	0,01 – 0,15	60
En la mayoría de los electrodomésticos, la intensidad del campo magnético a una distancia de 30 cm es considerablemente inferior al límite recomendado para el conjunto de la población de 100 μT .				Límite recomendado 5000 V/m

1.7. Efecto de los Campos magnéticos y su efecto en la salud reproductiva

En los últimos años en los servicios de telecomunicaciones en el Perú, ha incrementado la telefonía móvil. De acuerdo con el organismo supervisor de la inversión privada en telecomunicaciones (99) (OSIPTEL), en septiembre del 2008 la tasa de comunicaciones móviles alcanzo al 70.2 % con aproximadamente 20 millones de usuarios (99).

Los campos magnéticos no solo ejercen fuerzas físicas sobre objetos de metal sino también sobre cargas eléctricas en movimiento como es el cuerpo humano. Estos campos afectaran las células cargadas eléctricamente, esta fuerza puede reducir o acelerar el movimiento de las partículas (127).

Las redes eléctricas producen campos magnéticos que interaccionan con el cuerpo humano, estos campos magnéticos dan lugar campos eléctricos inducidos por el cuerpo humano los cuales son causantes de efectos biológicos (111).

La fertilización es importante para continuar con la vida de las especies. El rol del espermatozoide es fertilizar el ovocito y así dar origen a un nuevo ser. Sin embargo, de todas las parejas sexualmente activas el 12-15 % son infértiles. Se puede identificar un 50 % como componente masculino. La mayoría de las causas de infertilidad masculina son tratables (100). La calidad del semen es establecida de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (101). Las causas de infertilidad se pueden clasificar en cuatro categorías: a. producción de espermatozoides defectuosos, b. obstrucción en el tracto reproductivo, c. inflamación, d. desordenes sexuales (102). Además, en nuestra sociedad ha habido un incremento considerable de la tecnología y el aumento a la exposición de campos magnéticos de baja frecuencia, los efectos en la infertilidad del hombre son contradictorios y permanecen en estudio (3).

La comisión internacional de protección contra la radiación no ionizante (ICNIRP) evalúa toda la información científica sobre los posibles efectos de exposición a largo plazo sobre la salud humana (127).

Aún existe poca comprensión de la interacción de los campos magnéticos con los tejidos biológicos u organismos vivos. Recientemente la comisión internacional de protección contra la radiación no ionizante (ICNIRP) indican la densidad de flujo magnético máximo permisible para la exposición pública en general es de 200 μT (103).

La exposición a radiaciones ionizantes puede provocar daños en los tejidos u órganos expuestos como modificaciones moleculares en la expresión de genes, fragmentación de ADN, incrementar la producción de radicales libres (ROS). Se ha descrito en experimentos *in vitro* e *in vivo* efectos dañinos en la fertilidad masculina (104, 105).

Existen daños induciendo a una apoptosis de las células espermáticas en ratones (8, 9), disminución de hormonas sexuales, masa testicular, cantidad y movilidad de espermatozoides y población de células germinales, mientras aumenta niveles de testosterona y masas testiculares en estudios con animales (10-13). La exposición de

RF-EMF *in vitro* induce una disminución en la movilidad y actividad espermática, mientras que hubo un aumento de fragmentación de ADN y expresión génica de la clusterina seminal (CLU) (7).

Sin embargo, existen estudios de no afectar el número de espermatozoides, la histología o la masa testicular (106). Muchos estudios muestran resultados contradictorios, pero es claro que una alta dosis de campos magnéticos y un largo tiempo de exposición puede afectar las pruebas como en la inducción de apoptosis de células germinales testiculares en ratones (9, 13). Sin embargo, existen estudios experimentales que se plantean efectos beneficiosos en la fertilidad masculina como aumento de su movilidad espermática (107).

El 75 % de pacientes con rangos de fertilización baja, la causa severa es la oligozoospermia, asterozoospermia, teratozoospermia o anormal acrosomas asociados con poca o sin unión a la zona pelúcida (108-110). En el otro 25 % de los pacientes las causas no son obvias ya que es normal la unión del semen y la zona pelúcida (109).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Medios de cultivo

- Medio Biggers, Whitten and Whittingham (BWW)

2.1.2. Soluciones

- Solución de Eosina Y 0.5 %: Contení 50 mg de eosina Y en 10 mL de Cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.
- Solución Hiposmotica: Contení 0.1470 g de Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) y 0.2702 g de fructosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), disueltos en 20 mL de agua.
- Buffer Fosfato salino PBS: Cloruro de sodio (NaCl) 124 mmol/L, Fosfato monosódico (Na_2HPO_4) 10 mmol/L y Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 3 mmol/L.

2.1.3. Reactivos

- Gelatina (Sigma)
- Glutaraldehido 0,05% (Sigma)
- Rojo Ponceau
- Alcohol etílico 70%
- Suero de albumina bovina (BSA) (Sigma)
- Inhibidor de tripsina de frejol de soya (SBTI) (Sigma)
- Aptonina (Sigma)
- Ácido acético
- Metanol
- Reactivo de Bradford
- Tritón X-100 (Sigma)
- Glicerol 10 %
- HCl 1mM
- HCl 1M
- Benzoi Arginina Etil Ester (BAEE) (Sigma)

- Tris base (Sigma)
- KCl (Sigma)
- KH_2PO_4 (Sigma)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
- Na. Pyru (Sigma)
- Na. Lactato Pyru (Sigma)
- Glucosa (Sigma)
- NaHCO_3 (Sigma)
- Penicilina (Sigma)
- Estreptomicina (Sigma)
- Rojo fenol (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- CaCl_2 (Sigma)
- Agua destilada

2.1.4. Material biológico

Durante el desarrollo del trabajo se trabajaron con cuatro grupos de ratones por un periodo de 35 días, grupo I: 2 ratones control, grupo II: 2 ratones con exposición simulada (Sham Exposure), grupo III: 2 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 50 μT , grupo IV: 2 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 550 μT ; y con otros cuatro grupos de ratones por un periodo de 70 días, grupo I: 2 ratones control, grupo II: 2 ratones con exposición simulada (Sham Exposure), grupo III: 3 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 50 μT , grupo IV: 3 ratones con exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 550 μT , los cuales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Los ratones se mantuvieron a una temperatura de 25 a 27 °C, con libre acceso a la comida balanceada, agua y un fotoperiodo de 14/10 horas luz/oscuridad.

2.1.5. Material de plástico y vidrio

- Portaobjetos
- Cubreobjetos

- Matraz Erlenmeyer de 50 mL, 500 mL, 1000 mL
- Vaso de Precipitado de 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Bagueta de Vidrio
- Frasco Tapa Rosca Azul 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL
- Frasco Color Ámbar Oscuro
- Probeta de 100 mL, 250 mL
- Tips de 10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L
- Pipeta de 1 mL
- Pipetas Pasteur
- Filtro Millipore 0.45 μ m
- Filtro 40 μ m
- Pastilla Magnética
- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon de 15 mL, 50 mL
- Tubos eppendorf
- Racs
- Criovial de 2 mL
- Papel Toalla
- Gorro
- Guantes
- Mascarilla

2.1.6. Materiales del Bioterio

- Viruta
- Materiales de limpieza (Detergente, Lejía, Paño Absorbente)

2.1.7. Equipos

- Balanza analítica
- Estufa
- Autoclave
- Incubadora con CO₂

- Campana Extractora
- Cámara de Flujo Laminar
- Espectrofotómetro UV-VISIBLE
- Equipo de Baño María
- Centrifugadora
- Micropipetas (10, 50, 200, 1000 μ L)
- Microscopio de Luz
- Refrigeradora
- Cámara de Neubauer
- Potenciómetro
- Heat plate

2.2. Metodología

2.2.1. Diseño e implementación de un sistema generador de campos magnéticos de baja frecuencia basados en bobinas de Helmholtz para ratones de prueba en estudios biológicos

El diseño fue basado en el modelo Código correspondiente al proyecto Multidisciplinario con Código N° PMI2013J03, propuesto por el Ing. Víctor Cruz. Los cálculos para el diseño del sistema de exposición se realizaron mediante el software Matlab. El diseño se basó en condiciones aceptadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Los campos magnéticos generados por este sistema están basados en análisis de los límites de exposición recomendados por la Comisión Internacional de Protección contra las Radiaciones No Ionizantes (ICNIRP).

El diseño y construcción del sistema está basado en 04 bobinas de Helmholtz que se usaron para la exposición experimental y la simulada, ajustadas con soportes adecuados al tamaño de contenedores para ratones con cable AWG N°18 de 0.00102 m de diámetro, considerando un radio de la bobina de 0.36 m y 80 vueltas por cada carrete, con una separación entre carretes de 0.36 m y para la alimentación de voltaje se usaron 04 transformadores de 2.5 v, 4.5 v, 22.5 v y 45 v como muestra la Figura 9. Estos trabajos fueron realizados en la Facultad de Ingeniería Electrónica y Eléctrica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.



Figura 9. Sistema generador de campos magnéticos basados en bobinas de Helmholtz (111).

2.2.2. Exposición a campos magnéticos

Los ratones se agruparon en un grupo control (sin exposición a campo magnético), grupo de exposición simulada, grupo expuesto a un campo magnético de $50 \mu\text{T}$ y grupo expuesto a un campo magnético $550 \mu\text{T}$, 50 Hz a través de bobinas de Helmholtz como muestra la Figura 10, por un periodo de 35 días y 70 días.



Figura 10. Exposición de los grupos de estudio: A. Grupo control, B. Grupo con exposición simulada, C. Grupo con exposición a campo magnético de $50 \mu\text{T}$ y D. Grupo con exposición a campo magnético de $550 \mu\text{T}$.

2.2.3. Procedimiento experimental

El trabajo se realizó con un total de 18 ratones divididos en 2 grupos a 2 diferentes tiempos de tratamiento 35 días y 70 días como muestra la Figura 11:

Grupos de tratamiento por un periodo de 35 días

Grupos control

- **GRUPO I:** 2 ratones control a los 35 días

Grupos de Exposición Simulada

- **GRUPO II:** 2 ratones con exposición simulada (Sham exposure) por 35 días

Grupos de exposición de baja intensidad a 50 μ T

- **GRUPO III:** 2 ratones expuestos 35 días a baja intensidad 50-60 Hz ,50 μ T

Grupos de exposición de alta intensidad a 550 μ T

- **GRUPO IV:** 2 ratones expuestos 35 días a alta intensidad 50-60 Hz ,550 μ T

Grupos de tratamiento por un periodo de 70 días

Grupos control

- **GRUPO I:** 2 ratones control a los 70 días

Grupos de Exposición Simulada

- **GRUPO II:** 2 ratones con exposición simulada (Sham exposure) por 70 días

Grupos de exposición de baja intensidad a 50 μ T

- **GRUPO III:** 3 ratones expuestos 70 días a baja intensidad 50-60 Hz ,50 μ T

Grupos de exposición de alta intensidad a 550 μ T

- **GRUPO IV:** 3 ratones expuestos 70 días a alta intensidad 50-60 Hz, 550 μ T

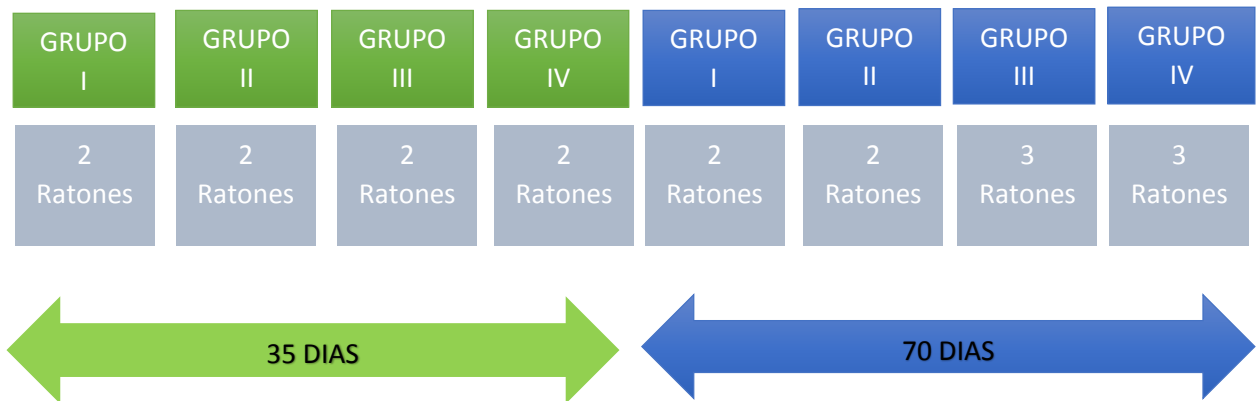


Figura 11. Flujograma de los grupos de estudio.

2.2.3.1. Colecta de la muestra

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se ubicó las colas de los epidídimos y se colocaron en medio de cultivo BWW atemperada a 37 °C suplementado con 4 mg/mL de suero albumina bovina (BSA), se hizo pequeñas incisiones en los epidídimos para liberar los espermatozoides en el medio, luego se separó los restos de tejido y se procedió a llevar la muestra de espermatozoides a una incubadora con una temperatura de 37 °C y 5 % de CO₂ para la estabilización del medio con los espermatozoides como muestra la Figura 12.

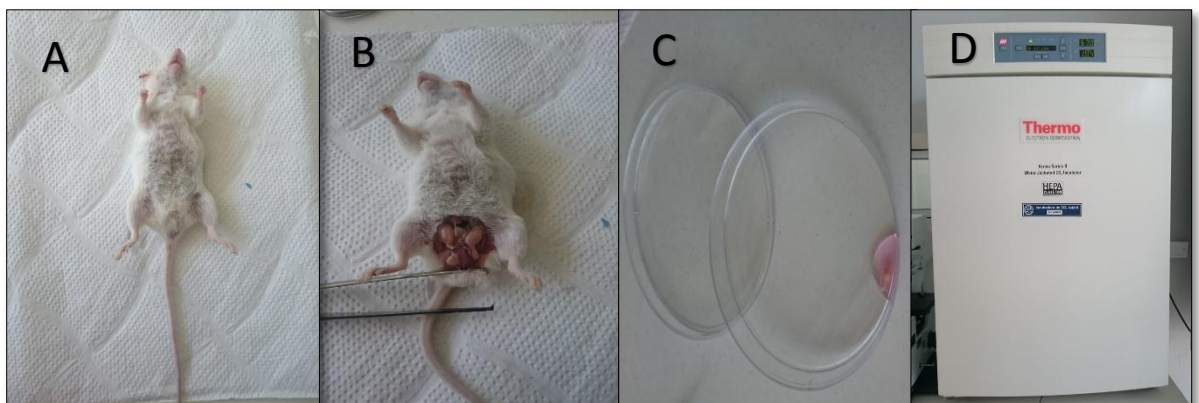


Figura 12. Metodología del aislamiento de espermatozoides de ratón: A. sacrificio, B. disección de la cola del epidídimo, C. aislamiento del epidídimo en medio de cultivo BWW y D. incubación 37 °C con 5 % de CO₂.

2.2.3.2. Evaluación de los parámetros espermáticos básicos

En los ratones de estudio se evaluó los parámetros espermáticos. Los parámetros fueron evaluados de acuerdo al criterio del Organismo Mundial de la Salud (101).

Movilidad espermática

Se tomó 10 μL de la muestra de espermatozoides y se colocó en un portaobjetos atemperado a 37 °C, finalmente se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio de luz en un objetivo de 40 X. La movilidad de cada espermatozoide fue clasificada de la siguiente forma

- P: movilidad progresiva
- NP: movilidad no progresiva
- I: inmóvil

Se evaluaron diferentes campos hasta obtener un total de 200 espermatozoides de los cuales se tomaron en cuenta la movilidad progresiva (P). Los valores fueron expresados en porcentajes.

Concentración espermática

Se realizó el conteo en una cámara de Neubauer, se realizó una dilución en un tubo eppendorf conteniendo 990 μL de agua destilada, luego se colocó 10 μL de muestra de espermatozoides. Se colocó 10 μL de esta dilución en el centro de la cámara, se dejó reposar por 5 minutos y se realizó el conteo de los 25 cuadrados. El resultado se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

Vitalidad espermática

Se evaluó la vitalidad de los espermatozoides mediante el uso del colorante vital eosina Y al 0.5 %, para diferenciar entre espermatozoides vivos y muertos. Se tomó 10 μL de la muestra y se colocó sobre un portaobjeto previamente atemperado a 37 °C con 3 μL del colorante vital Eosina Y, se mezclaron ambas gotas y se dejó incubando por 2 minutos, finalmente se colocará un cubreobjetos y se observará al microscopio de luz a 40 X. Se evaluaron 200 espermatozoides. La vitalidad se caracterizó de la siguiente forma:

- Espermatozoides vivos: cabeza blanca
- Espermatozoides muertos: cabeza rosada

Integridad de membrana plasmática (Test de HOST)

El test de HOST se preparó una solución hiposmótica colocando 90 μL de la solución en un tubo eppendorf y se agregó una alícuota de 10 μL de la muestra de espermatozoides, se incubó a 37 °C por 30 minutos. Se evaluó los espermatozoides presentando un típico enrollamiento de la cola (causado por el hinchamiento de la membrana plasmática).

El resultado fue expresado en porcentaje de espermatozoides con la membrana intacta, es decir el porcentaje de espermatozoides que responden al test Hiposmótico.

2.2.3.3. Estandarización del protocolo de determinación de la Actividad Enzimática individual en espermatozoides mediante halos de digestión en Gelatina

La digestión de gelatina se evaluó mediante la medición de halos de digestión de la gelatina (76, 88). Sobre un portaobjeto limpio y previamente refrigerado, se depositó en un extremo de este una gota de 100 μL de una solución de gelatina (Sigma, Type A from porcine skin) al 3 %. Luego las placas se mantuvieron a temperatura ambiente (21°C) hasta su completo secado.

Posteriormente, se fijó con una solución de glutaraldehído al 0.05% (V/V) por inmersión por 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se almacenaron toda la noche en cámara húmeda a 4 °C.

Luego, sobre los portaobjetos con gelatina, se depositó 50 μL de las muestras de espermatozoides. Las muestras se extendieron en el portaobjeto y se incubaron a 37 °C y 5% de CO_2 por 24 h. Posteriormente se tiñeron con Rojo Ponceau (Sigma) por 5 minutos y lavados con agua destilada, para finalmente observar al microscopio de luz a 40 X. Los halos de digestión se cuantificaron de acuerdo al diámetro de los halos de digestión en micrones en un programa llamado Image J. Los espermatozoides que presentaban un halo de mayor diámetro en la cabeza del espermatozoide era una mayor actividad enzimática de acrosina mientras que los que no presentaban halo o presentaban un halo pequeño era por una disminución de actividad.

Para la evaluación de los halos de digestión de gelatina en un portaobjeto, se realizaron 2 réplicas experimentales por grupo de estudio, se contabilizó un mínimo de 200 espermatozoides por tratamiento evaluado.

Se evaluó controles negativos usando SBTI y Aprotonina como inhibidores de la actividad enzimática de acrosina. Se extrajo una alícuota de 200 μL de la muestra y se depositó en un eppendorf con 800 μL medio de cultivo BWB con 1 mg/mL de inhibidor de tripsina de frejol de soya (SBTI). Otra alícuota de 200 μL se extrajo de la muestra de espermatozoides y se depositó en un eppendorf con 800 μL medio de cultivo BWB con 1 mg/ml de inhibidor de aprotonina. Ambas muestras fueron incubadas a 60 minutos a 37 °C y 5 % CO_2 . Finalmente se extendieron 50 μL de las muestras sobre un portaobjetos con gelatina, se incubaron a 38°C y 5% de CO_2 por 24 h. Posteriormente se tiñeron con Rojo Ponceau (Sigma) por 5 minutos y se lavaron con agua destilada para finalmente observar al microscopio de luz a 40 X.

2.2.3.4. Medición de la actividad enzimática de extractos ácidos por hidrolisis con BAEE

Extracción ácida de enzimas acrosomales

Los espermatozoides extraídos de la cola del epidídimo en el medio de cultivo BWB, se centrifugaron a 1700 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con NaCl a 0.5 %, se dejó incubando por una hora a 37 °C, se centrifugó a 1700 rpm por 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con la solución acuosa de Tritón X-100 al 0.1% y se centrifugó inmediatamente a 1700 rpm por 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con HCl 1mM y glicerol al 10 %, se ajustó el pH a 2.8. Finalmente, se incubaron toda la noche a 4 °C, para luego centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C, se recuperó el sobrenadante en alícuotas de 50 μL , el cual se almacenó a -20 °C.

Medición de la concentración proteica de extractos ácidos

La concentración (mg/mL) de proteína presente en la muestra fue cuantificada mediante el Método de Bradford (112), previa calibración con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) a través de espectrofotometría como muestra el Anexo 6.

Para la medición de la concentración proteica, se tomaron 20 μL del extracto espermático ácido de cada muestra (descongeladas a T° ambiente) y se mezclaron con 180 μL de agua destilada y 1800 μL del reactivo de Bradford (100 mg de azul de Comassie; 50 mL de etanol al 95%; 100 mL de ácido fosfórico al 85%, se ajusta a un litro con agua y se filtra; es estable por 2 meses), en un criovial de 2 mL. Además, para cada muestra se realizó un control que contenía 200 μL de agua y 1800 μL del reactivo de Bradford. Luego las muestras fueron incubadas durante 12 minutos a 37°C en baño maría y se midió la absorbancia del contenido de cada tubo en el espectrofotómetro, para lo cual se utilizó una cubeta de plástico y una longitud de onda (λ) de 595 nm.

La ecuación de la recta, anteriormente descrita, se realizó mediante las concentraciones conocidas de BSA y así extrapolando el resultado a la ecuación de la recta estandarizada previamente.

Ya conocida la concentración de proteína de las muestras de extracto espermático ácido del acrosoma se midió la actividad enzimática de acrosina, para lo cual se utilizó la hidrólisis de éster de bajo peso molecular (113, 114).

Medición de la concentración enzimática de acrosina por hidrólisis con BAEE

Para la medición de la actividad enzimática de acrosina, se preparó una solución de BAEE 500 μM , Tris base 50 mM, CaCl_2 50 mM y a pH 8, la cual fue usada como sustrato enzimático. Posteriormente, se colocaron 3 mL de esta solución en un tubo de ensayo para ser incubados con 20 μL de extracto ácido, realizando dos mediciones por muestra. Luego de la incubación durante 30 minutos a 37°C en baño maría, la reacción se detuvo por frío con hielo picado. La medición de la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro se realizó en una cubeta de cuarzo, a una longitud de onda (λ) de 253 nm y con una lámpara de luz ultravioleta (UV).

Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 μmol de sustrato (BAEE) en 1 minuto. Para esto, se utilizó un coeficiente de extinción molar de $1150 \text{ L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para convertir los cambios de densidad óptica a micromoles de BAEE hidrolizado.

2.2.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de un factor para comparar medias y prueba t de Student para identificar si había diferencia entre los diferentes tratamientos. Los datos fueron expresados en media \pm desviación estándar, y las diferencias fueron aceptadas como diferencias significativas cuando $P < 0.05$.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las investigaciones en modelos experimentales no siguen un patrón de acuerdo a la densidad de flujo magnético, frecuencia, intensidad sobre los sistemas biológicos, se han realizado pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* en animales y humanos. Sin embargo, existen resultados contradictorios, por este mismo motivo la polémica si realmente los campos magnéticos afectan o no a la salud.

3.1.Resultados de los parámetros espermáticos: concentración, movilidad, vitalidad e integridad de membrana plasmática (Test de Host).

3.1.1. Concentración de espermatozoides

✓ Tratamiento por un periodo de 35 días

Se comparó las medias del grupo I (20 ± 2.83 células $\times 10^6/\text{mL}$) con los demás tratamientos obteniéndose una diferencia significativa en los valores de concentración espermática ($p < 0.05$) en el grupo II (35.5 ± 3.54 células $\times 10^6/\text{mL}$) y grupo III (34.5 ± 3.54 células $\times 10^6/\text{mL}$) mientras que en el grupo IV (25.5 ± 2.12 células $\times 10^6/\text{mL}$) no hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Las medias de los resultados de la concentración espermática se muestran en la Figura 13.

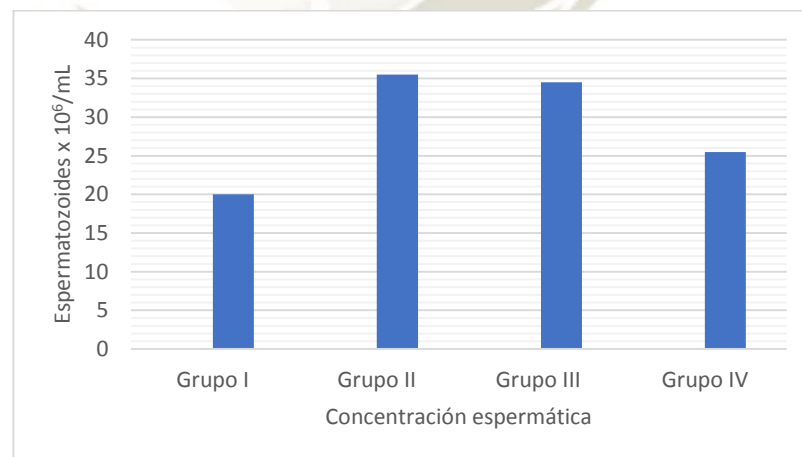


Figura 13. Gráfica de las medias de la concentración de los grupos I, II, III y IV a los 35 días.

✓ Tratamiento por un periodo de 70 días

Entre los grupos de exposición (II, III y IV) y el grupo I (47.5 ± 1.60 células $\times 10^6$ /mL), se realizó una comparación de medias obteniéndose una diferencia significativa en los valores de concentraciones espermáticas ($p < 0.05$) entre el grupo I con respecto al grupo III (27 ± 2.65 células $\times 10^6$ /mL) y IV (19 ± 5.20 células $\times 10^6$ /mL), mientras que con el grupo II (21 ± 1.41 células $\times 10^6$ /mL) no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$).

Las medias de los resultados de la concentración espermática se muestran en la Figura 14.

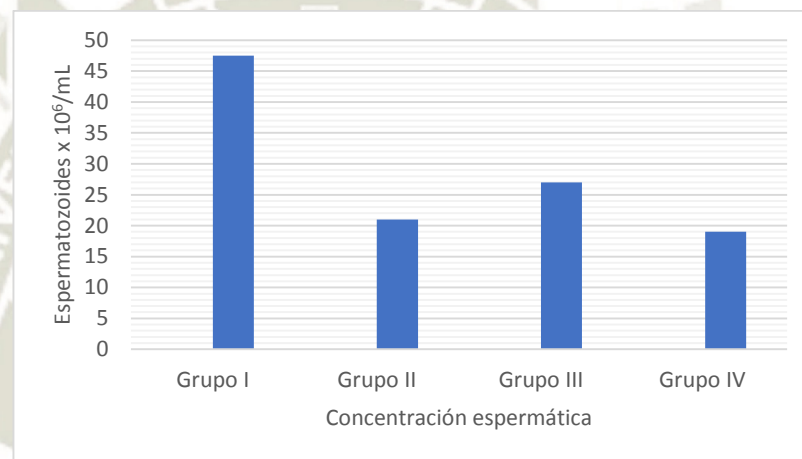


Figura 14. Gráfica de las medias de la concentración de los grupos I, II, III y IV a los 70 días.

Estudios anteriores mostraron que la exposición de ratas adultas a CM-ELF de 50 Hz de $500 \mu\text{T}$ por 4 horas/día, 7 días/ semana durante 4 y 8 semanas sobre la masa corporal, peso testicular y epididimario, número de espermatozoides, tasa de espermatozoides anormales en la cola del epidídimo, nivel de testosterona, frecuencia de estos del ciclo del epitelio germinal, apoptosis de células germinales y estado oxidativo en la región testicular. En los resultados no se observaron diferencias significativas, por lo cual sugieren que los CM de baja frecuencia no afectan la fertilidad de animales expuestos (115).

En ratones macho de la cepa BALB/c fueron sometidos a una exposición continua a campos magnéticos de 60 Hz y a intensidades de 2, 20, 100 y $200 \mu\text{T}$ por un periodo

de 24 h/día por 2, 3, 4, 6 y 8 semanas. Obteniendo como resultado que la masa testicular no fue afectada en ningún caso, en cambio incremento de las células apoptóticas de las células germinales testiculares y disminuyó la cantidad de espermatozoides en el epidídimo (116).

En nuestro estudio se observó que los efectos de los campos magnéticos a ratones de edad adulta a los 35 días no mostraron una disminución de concentración de espermatozoides, mientras que a los 70 días sí mostró una disminución y fue más evidente en el grupo IV en comparación con el grupo I como indicaría (116).

3.1.2. Movilidad de espermatozoides

✓ Tratamiento por un periodo de 35 días

La movilidad espermática no se vio afectada por los campos magnéticos a los 35 días de exposición, se realizó una comparación entre el grupo I (24.69 ± 5.14 %), respecto al grupo II (13.55 ± 0.36 %), III (30.05 ± 4.43 %) y IV (25.91 ± 7.18 %) no presentó una disminución significativa ($p > 0.05$).

Las medias de los resultados de la concentración espermática se muestran en la Figura 15.

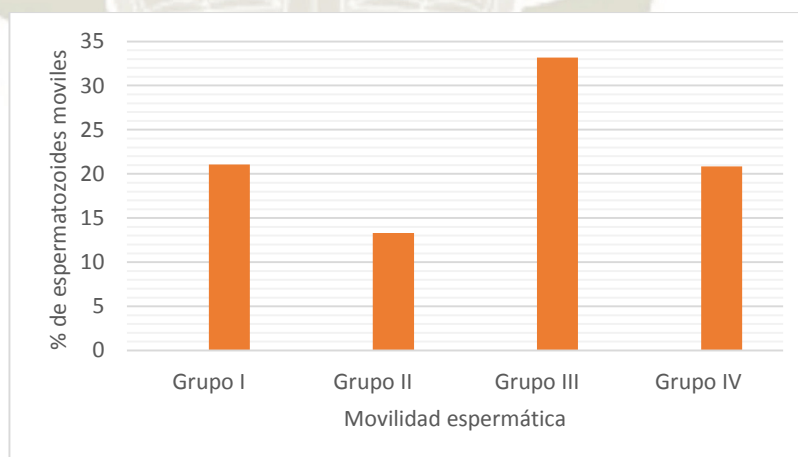


Figura 15. Gráfica de las medias de la movilidad espermática de los grupos I, II, III y IV.

✓ Tratamiento por un periodo de 70 días

En los grupos de estudio no se vio una diferencia significativa en la movilidad espermática ($p > 0.05$) comparando el grupo I (17.01 ± 4.24) %, respecto al grupo II (18.25 ± 8.38) %, grupo III (14.99 ± 1.86) % y grupo IV (11.09 ± 1.27) %.

Las medias de los resultados de la concentración espermática se muestran en la Figura 16.

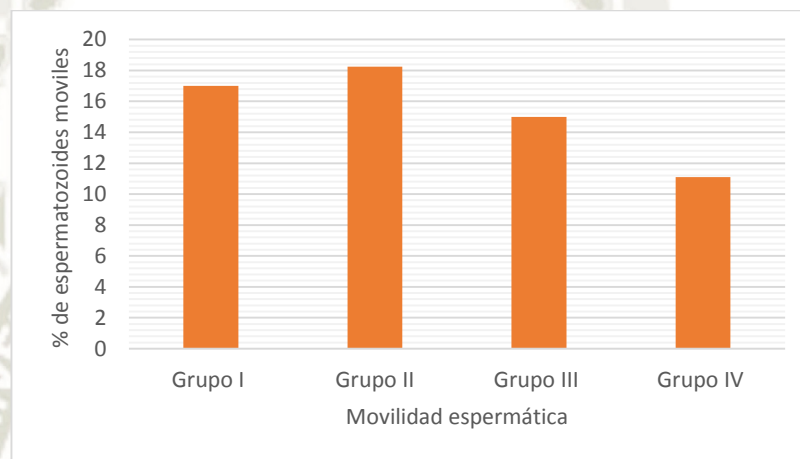


Figura 16. Gráfica de las medias de la movilidad espermática de los grupos I, II, III y IV.

En el 2007, Iorio et al. (117), demuestra que la exposición *in vitro* de una onda sinusoidal de 5 mT con una frecuencia de 50 Hz por 21 horas, no produjo ningún efecto significativo sobre la movilidad espermática, estos resultados coinciden con los resultados del presente trabajo ya que la exposición a 50 μ T y 550 μ T a los dos periodos de tiempos de 35 días y 70 días, no mostraron disminución en la movilidad de los espermatozoides. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos, no se observó una disminución significativa en el periodo de 35 y 70 días de exposición (117).

3.1.3. Vitalidad de espermatozoides

✓ Tratamiento por un periodo de 35 días

Entre los grupos de estudio comparando el grupo I (9.95 ± 0.07) % con el grupo II (9.07 ± 1.32) % y el grupo de IV (9.28 ± 2.43) % no se vio una diferencia significativa ($p > 0.05$), mientras que con el grupo de III (19.79 ± 2.11) % se vio una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las medias de los resultados de la vitalidad espermática se muestran en la Figura 17.

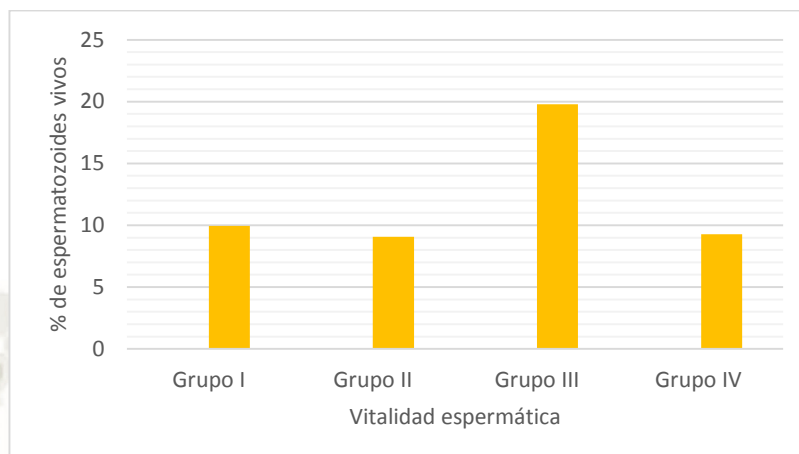


Figura 17. Gráfica de las medias de la viabilidad de los grupos I, II, III y IV.

✓ **Tratamiento por un periodo de 70 días**

Entre los grupos de estudio correspondientes a los grupos de exposición (II, III y IV) comparando el grupo I (5.44 ± 0.32 %) con el grupo II (9.63 ± 2.1 %) y el grupo de III (8.37 ± 4.16 %) no se observó una diferencia significativa ($p > 0.05$), en cambio en comparación con el grupo IV (8.95 ± 1.26 %) si se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Las medias de los resultados de la vitalidad espermática se muestran en la Figura 18.

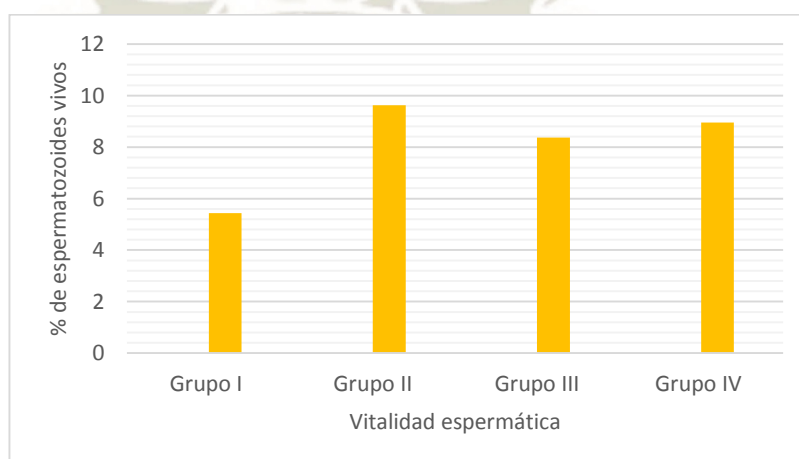


Figura 18. Gráfica de las medias de la viabilidad de los grupos I, II, III y IV.

Se investigó el efecto de uso de teléfono celular en 361 muestras de semen de humanos, se obtuvieron como resultado una disminución de la concentración espermática, movilidad, viabilidad y morfología (118).

La exposición de CM-ELF de baja frecuencia sobre ratones de edad temprana 14 dpp, 4 dpp y de edad adulta 73 dpp, 77 dpp por un periodo de 35 días, los resultados obtenidos se observaron una disminución la viabilidad y la concentración de células madre espermatogoniales en ratones de edad temprana, mientras que en ratones de edad adulta no fueron afectados significativamente. Sin embargo, existe la autofagia (programa de recuperación endógena) es una respuesta de defensa ante el estrés celular lo cual mantendría la fertilidad masculina de individuos expuestos en su adultez (119).

A los 35 y 70 días de exposición no se observó una disminución significativa en el parámetro espermático de la viabilidad.

3.1.4. Integridad de membrana plasmática (Test de HOST)

✓ Tratamiento por un periodo de 35 días

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de exposición (II, III y IV) en comparación con el grupo I (8.14 ± 0.52) % se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grupo II (17.69 ± 1.68) % y el grupo IV (16.25 ± 0.16) %, mientras que con el grupo III (12.05 ± 3.34) % no hay diferencia significativa ($p > 0.05$).

Las medias de los resultados de la integridad de la membrana plasmática se muestran en la Figura 19.

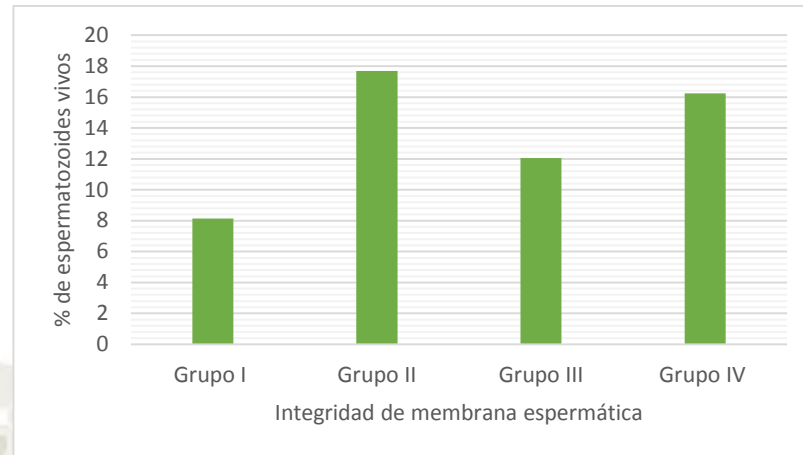


Figura 19. Gráfica de las medias de la integridad de membrana de los grupos I, II, III y IV.

✓ **Tratamiento por un periodo de 70 días**

Entre los grupos de estudios correspondientes a los grupos de exposición (II, III y IV) como son el grupo II (15.23 ± 13.82) %, grupo III (10.12 ± 5.96) % y grupo IV (17.99 ± 3.62) %, en comparación con el grupo I (10.29 ± 0.69) % no existe diferencia significativa ($p > 0.05$).

Las medias de los resultados de la integridad de la membrana plasmática se muestran en la Figura 20.

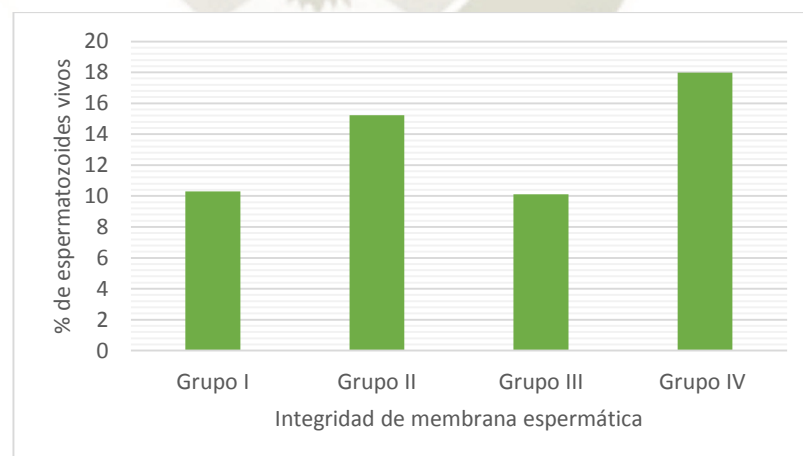


Figura 20. Gráfica de las medias de la integridad de membrana de los grupos I, II, III y IV.

A los 35 y 70 días de exposición no se observó una disminución significativa en el parámetro espermático de la integridad de la membrana plasmática.

3.2. Medición de la actividad de acrosina mediante la digestión de gelatina en placa

Para la identificación de la actividad enzimática de acrosina presente en los espermatozoides, se utilizó las técnicas de digestión de gelatina en placa. En 1970 Gaddum y Blandau (85, 86, 88) utilizaron por primera vez la técnica de digestión de gelatina en placa, siendo una técnica simple para determinar la acrosina y anteriormente utilizada en diferentes investigaciones para observar la actividad de dicha enzima en diferentes animales y sometida a diferentes tratamientos (85, 86, 88).

En los diferentes tipos de tratamiento, se encontraron halos de digestión de gelatina de diferentes diámetros como muestra la Figura 21 y Figura 22.



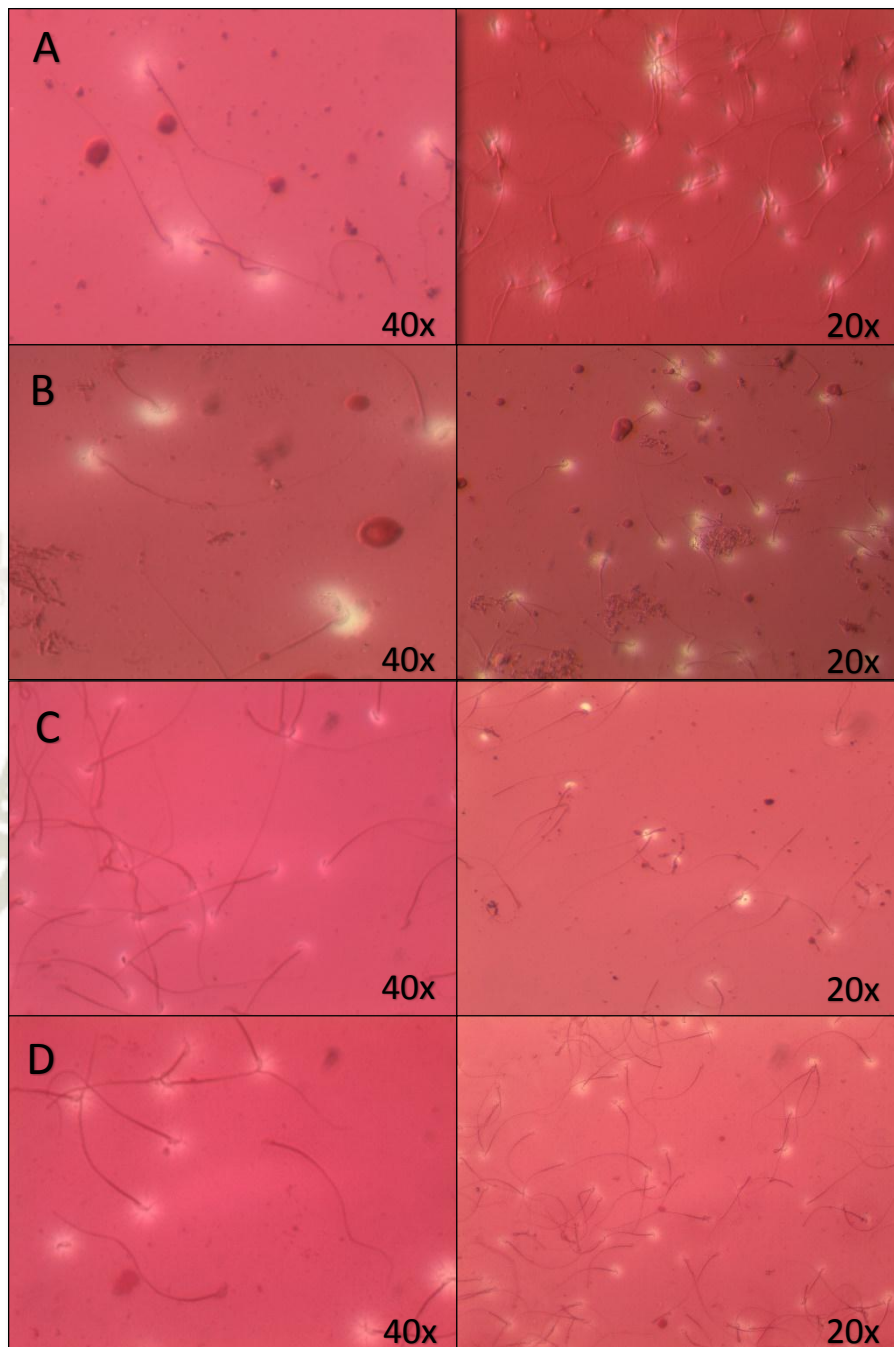


Figura 21. Imágenes de halos de digestión en portaobjetos de espermatozoides, teñidos con Rojo Ponceau y obtenidas con el microscopio de luz (40 X y 20 X). Se observan espermatozoides con halos de digestión de diferentes diámetros, los cuales se pueden diferenciar en: grupo I (A), grupo II (B), grupo III (C) y grupo IV (D).

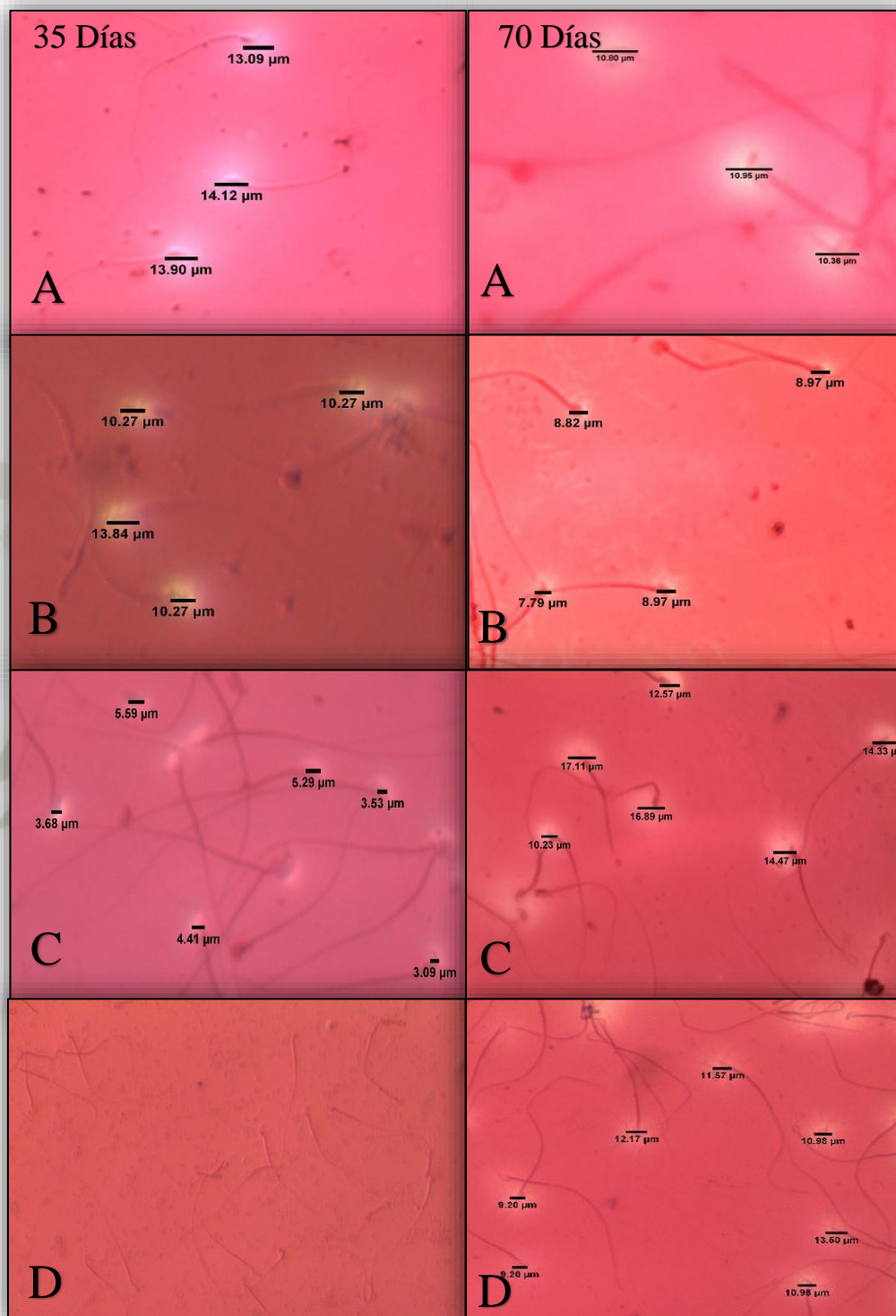


Figura 22. Imágenes de halos de digestión medidos con el programa Image J y obtenidas con el microscopio de luz a 40 X. Se observan espermatozoides con halos de digestión de diferentes diámetros, los cuales se pueden diferenciar en: grupo I (A), grupo II (B), grupo III (C) y grupo IV (D), donde cada columna pertenece a los dos periodos de tiempo, 35 y 70 días.

La actividad enzimática de acrosina mediante el método de hidrolisis de gelatina, se describió en términos de promedios. Utilizando los valores promedios dados en micrómetros (μm) de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de los espermatozoides para el análisis estadístico como muestra la Figura 23.

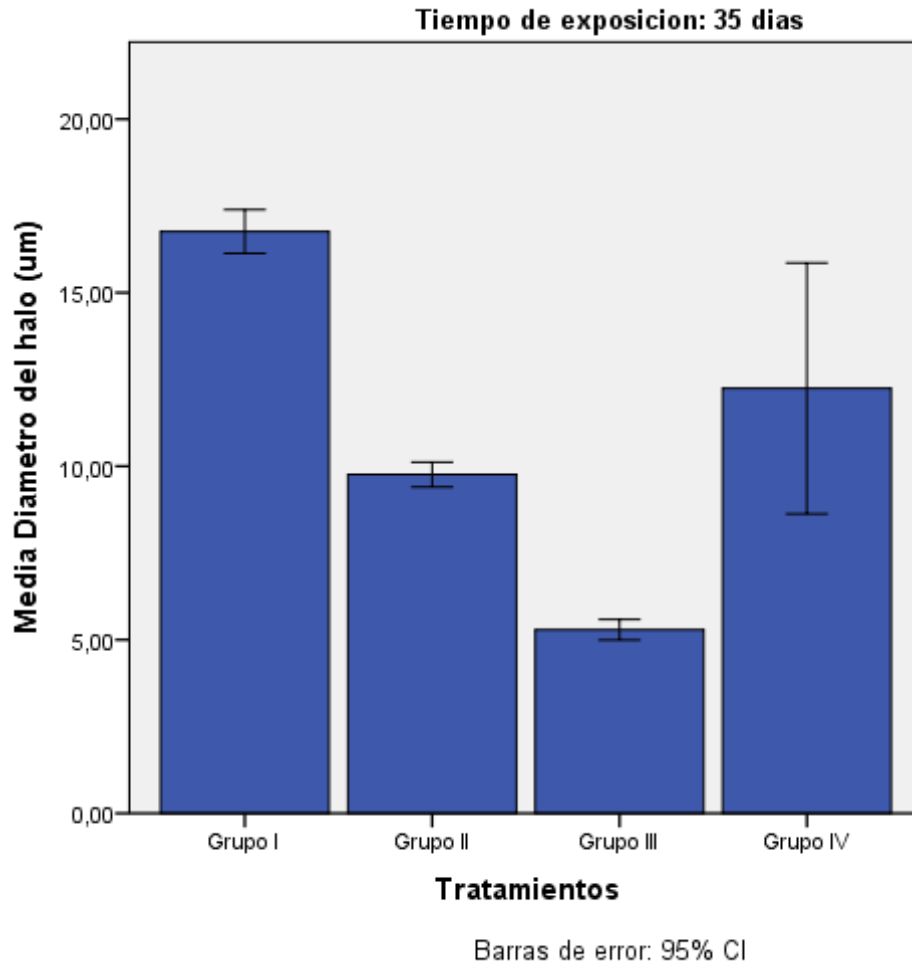


Figura 23. Promedio de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 35 días.

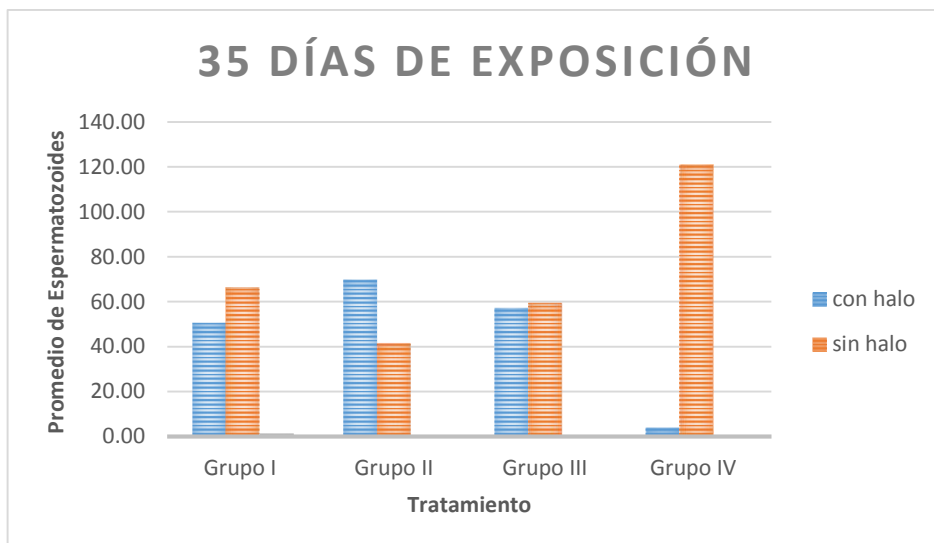


Figura 24. Promedio de la cantidad de espermatozoides con y sin halos de digestión sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 35 días.

De acuerdo al tamaño de los halos de digestión a los 35 días, en los diferentes tratamientos se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo I (16.76 ± 3.19), grupo II (9.76 ± 2.13), el grupo de III (5.29 ± 2.57) y el grupo de IV (10.36 ± 5.05) como muestra la Figura 23. Sin embargo, también se demostró que ha mayor dosis de exposición a campo magnético los grupos presentaban mayor cantidad de espermatozoides sin halos de digestión y menor cantidad de espermatozoides con halos de digestión como muestra la Figura 24, es decir, que a mayor dosis exposición de campos magnéticos, la actividad enzimática de acrosina es menor.

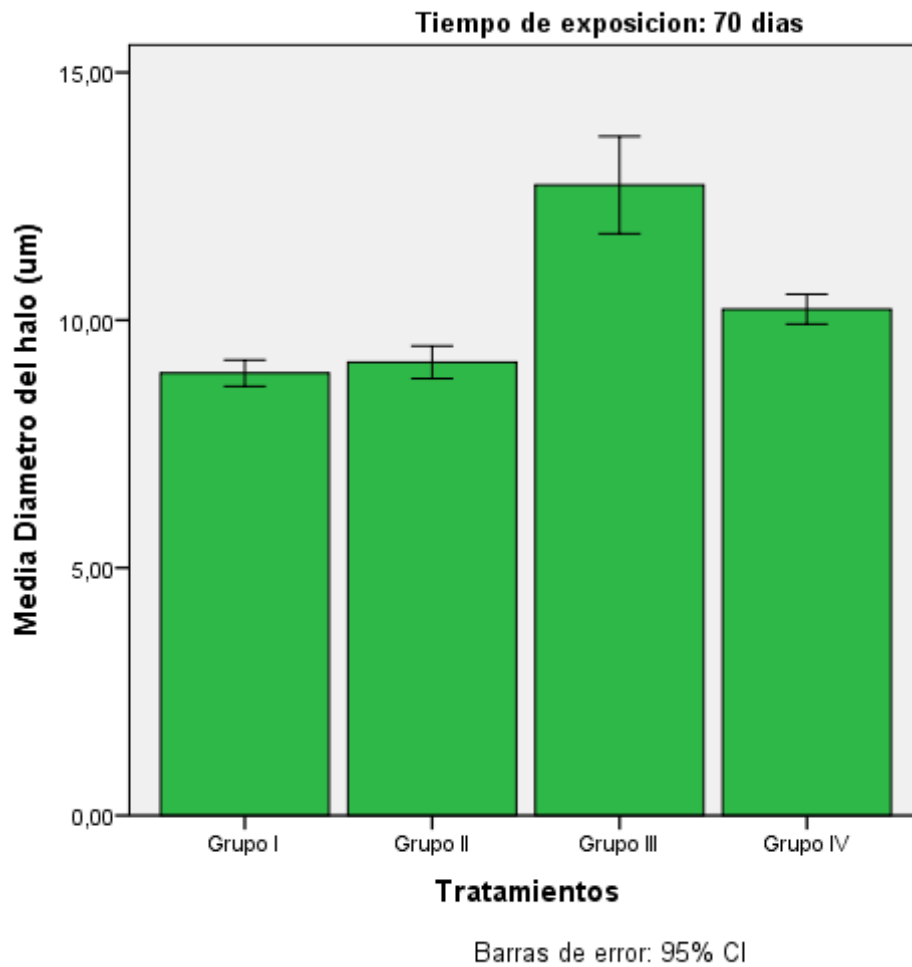


Figura 25. Promedio de los diámetros de los halos de digestión de gelatina de espermatozoides sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 70 días.

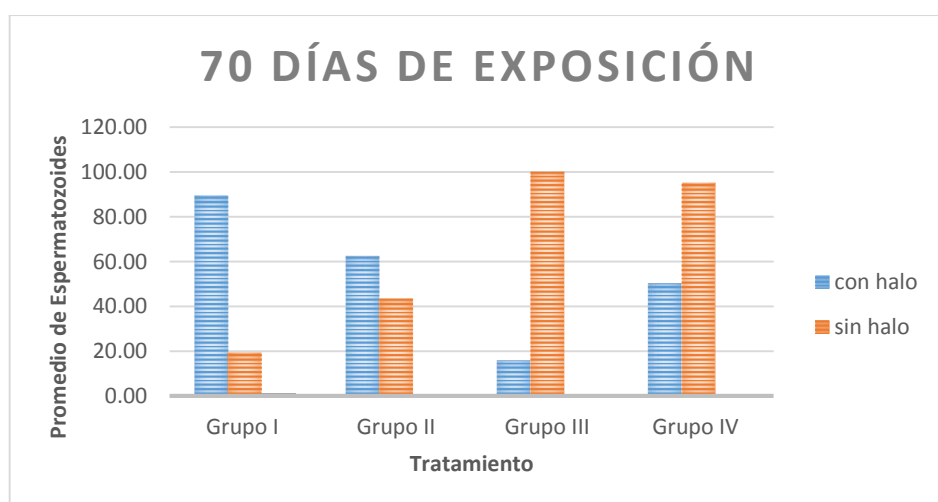


Figura 26. Promedio de la cantidad de espermatozoides con y sin halos de digestión sometidos a diferentes tratamientos en un tiempo de 70 días.

El promedio de los halos de digestión presentados por los espermatozoides a los 70 días del grupo I (8.93 ± 1.80), grupo II (9.15 ± 1.85), grupo de III (12.73 ± 3.39) y grupo de IV (10.22 ± 1.87), entre los grupos mostraron una diferencia significativa ($p < 0.05$). Sin embargo, el grupo I (8.93 ± 1.80) con el grupo II (9.15 ± 1.85) no mostraron una diferencia significativa ($p > 0.05$). Sin embargo, también se demostró que a mayor dosis de exposición a campo magnético los grupos presentaban mayor cantidad de espermatozoides sin halos de digestión y menor cantidad de espermatozoides con halos de digestión como muestra la Figura 26, es decir, que a mayor dosis exposición de campos magnéticos, la actividad enzimática de acrosina es menor.

En relación a los controles negativos, incubados con inhibidores tipo tripsina como es el SBTI y la aprotonina, no se observaron halos de digestión en los portaobjetos con gelatina, lo que implicaría que la formación de halos sería provocados por la actividad de acrosina.

En el 2015, Adel Zalata et al. (7), tuvo como objetivo investigar los efectos de la exposición por una hora *in vitro* de radiofrecuencia electromagnética (RF-EMF) que emiten los teléfonos celulares sobre la movilidad espermática, la fragmentación del ADN espermático y la expresión del gen de la clusterina seminal (CLU). En los resultados hubo una disminución significativa en la motilidad de los espermatozoides, y actividad de acrosina espermática, mientras que hubo un aumento del porcentaje de fragmentación del ADN espermático, expresión del gen CLU (7).

Un aumento de especie reactiva de oxígeno (ROS) se da por la exposición a campos electromagnéticos (CEM) (120) en la región testicular, pero este aumento de ROS puede ser revertido usando antioxidantes. Se evaluó el efecto en ratas macho expuestas a CEM con y sin ácido rosmarínico (compuesto fenólico con capacidad antioxidante y antiinflamatorias), los resultados demostraron que el ácido rosmarínico puede prevenir el efecto del daño celular en especial la apoptosis de las células sertoli causado por la exposición a CEM (121).

Los ROS causan estrés oxidativo (SO) causante de un daño celular, el SO ocurre cuando hay un desequilibrio entre los ROS y la capacidad de absorción de antioxidantes. Los espermatozoides son sensibles a este tipo de estrés por que poseen

una cantidad limitada de antioxidantes endógenos y presentan abundante sustrato para los ROS en forma de ácidos grasos saturados y ADN (122). Los altos niveles de ROS son la principal causa de la infertilidad masculina y deterioran procesos importantes para la fecundación como la capacitación, la reacción acrosómica, fusión de espermatozoide y ovocito, fragmentación del ADN (123).

En el 2004, Zalata et al. (124), evidenció una relación entre el estrés oxidativo y la actividad de acrosina, obtuvo muestras de 30 hombres infértiles y 12 voluntarios normozoospermicos fértiles. En los resultados sugieren una disminución de la actividad de la acrosina por el estrés oxidativo (124).

La disminución de la actividad de la acrosina a los 35 días de exposición, se contrasta con lo encontrado por Adel Zalata et al., 2015 (7), quien sugiere que el estrés oxidativo juega un rol importante ya que es el proceso de deterioro celular donde hay una producción de ROS, los cuales son producidos por la mitocondria de los espermatozoides, las defensas de antioxidantes son abrumadas y se induce el daño oxidativo, lo que va a llevar a una peroxidación lipídica de la membrana acrosómica del espermatozoide y una disminución de la actividad enzimática de la acrosina, al igual que se dará una pérdida de capacidad de fertilización y vitalidad (7). Sin embargo, a los 70 días de exposición se obtuvo una diferencia significativa entre los tratamientos, pero no una disminución significativa entre el grupo I y el grupo IV.

3.3. Actividad enzimática de acrosina por la hidrólisis de éster de bajo peso molecular (BAEE) a través de espectrofotometría

La actividad enzimática de la acrosina durante la capacitación espermática se describió en términos de promedios. Se utilizaron los valores promedios para el análisis estadístico dados en unidad de actividad enzimática ($\mu\text{mol BAEE/mL/mg}$), de los espermatozoides.

Los promedios y desviación estándar obtenidos en cada tratamiento en los diferentes tiempos de exposición a partir de espermatozoides se muestran en la figura 25.

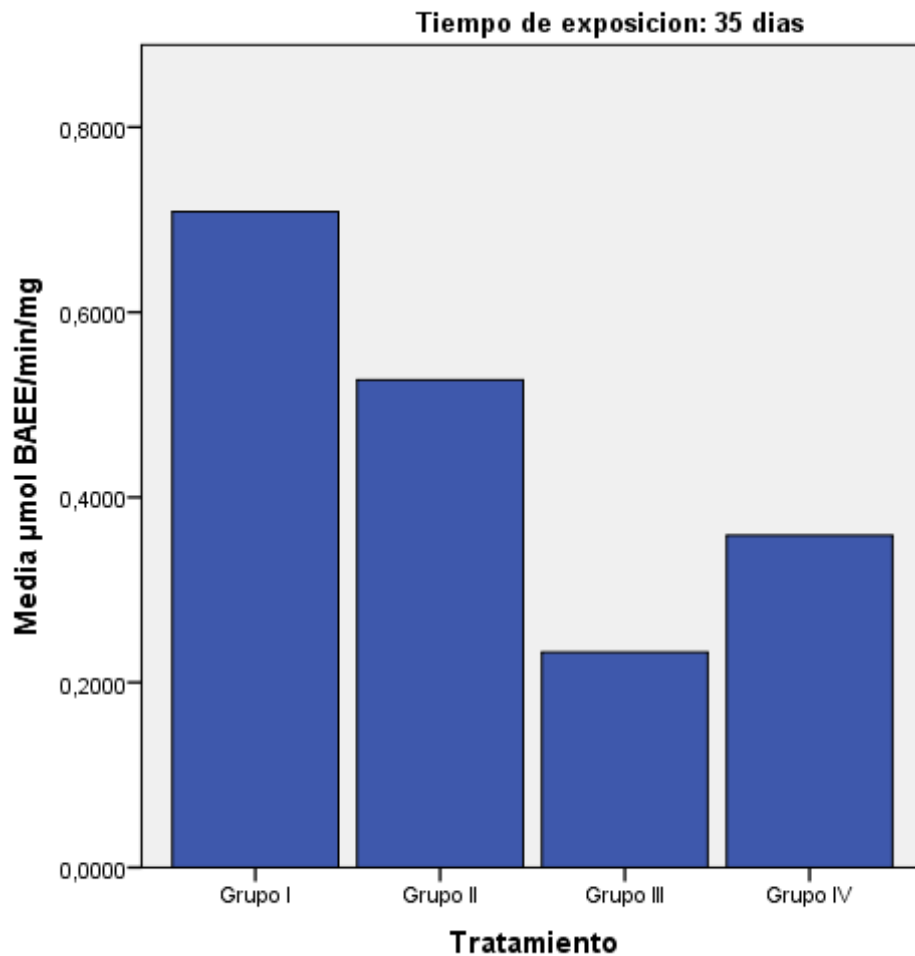


Figura 27. Actividad enzimática de acrosina de extractos de espermatozoides en dos tiempos de exposición 35 días, medida como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 micromol de BAEE en 1 minuto en cada tratamiento.

Sin embargo, con una exposición de 35 días comparando el grupo I (0.71 ± 0.29) con los demás grupos II (0.53 ± 0.26), III (0.23 ± 0.06) y IV (0.36 ± 0.24), no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

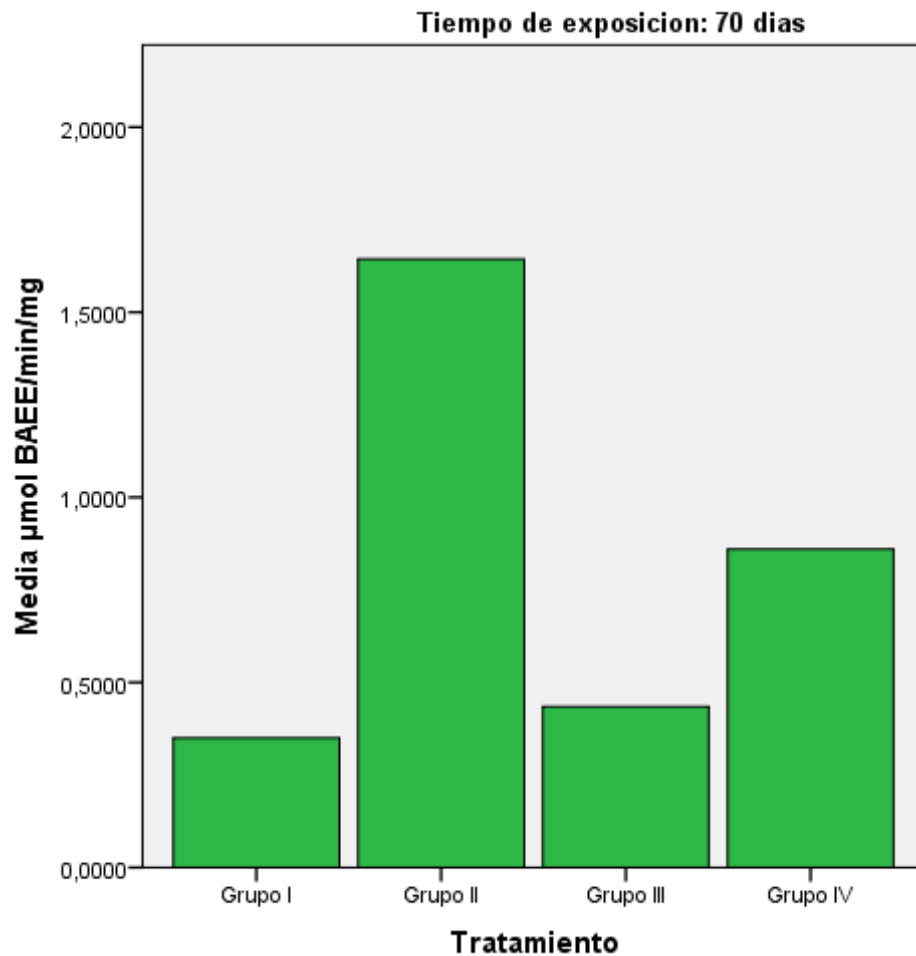


Figura 28. Actividad enzimática de acrosina de extractos de espermatozoides en dos tiempos de exposición 70 días, medida como la cantidad de acrosina que hidroliza 1 micromol de BAEE en 1 minuto en cada tratamiento.

Al evaluar a los 70 días los espermatozoides del grupo I (0.35 ± 0.09) con el grupo II (1.64 ± 0.29), y con el grupo IV (0.85 ± 0.02); si se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). En cambio, con el grupo III (0.43 ± 0.10) no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$). Pero el grupo II (1.64 ± 0.29), con el grupo III (0.43 ± 0.10) y IV (0.85 ± 0.02) si se observa una diferencia significativa ($p < 0.05$).

No existe estudio de los efectos de los campos magnéticos de baja frecuencia sobre la actividad enzimática de la acrosina usando la técnica del hidrolisis de un éster de bajo peso molecular (BAEE), el resultado muestra una disminución de la actividad de acrosina a un periodo de 70 días, mientras que a los 35 días no se muestra una disminución significativa.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan información respecto a la actividad enzimática de acrosina cuando se requiere realizar un análisis de fertilidad y la causa es inexplicable, siendo útil para definir protocolos de fecundación *in vitro* más avanzados y proponer mejoras en las tecnologías reproductivas en animales y humanos. Además, entrega información de la actividad enzimática de acrosina de espermatozoides sometidos a campos magnéticos que debe ser considerada para tener mayor conocimiento acerca de estos.



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Primero. Las emisiones de campos magnéticos de baja frecuencia tienen un impacto negativo a los 70 días de exposición, pero a los 35 días no se observó una disminución significativa; sin embargo, en la movilidad, vitalidad y test de Host no presentaron un impacto negativo a los 35 y 70 días de exposición.

Segundo. La disminución de la actividad de acrosina fue evidenciado por la estandarización del protocolo de la digestión de gelatina en placa, se observó una disminución del diámetro de los halos a los 35 días, pero a los 70 días no se obtuvo una disminución significativa.

Tercero. La actividad enzimática de acrosina presenta una disminución en los ratones expuestos a campo magnético a los 70 días, pero a los 35 días de exposición no presenta una disminución significativa, lo cual fue demostrado por la técnica de espectrofotometría con BAEE.

Cuarto. Los espermatozoides expuestos a mayor dosis y tiempo de campo magnético presentaron menor actividad de acrosina.

RECOMENDACIONES

1. Realizar una prueba *in vitro* con la misma dosis y tiempo de exposición a campo magnético, con las mismas técnicas para contrastar resultados.
2. Seguir realizando estudios sobre la exposición de campos magnéticos con nuevas técnicas sobre la relación de ROS y la actividad enzimática de acrosina.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sanchez GMMML, Cuya MEV. Efecto de la exposición crónica a campos magnéticos de baja frecuencia en las células germinales de ratón.
2. World Health Organization [Internet].
3. Non-ionizing radiation, Part 1: static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2002;80:1-395.
4. Valdivia M, Sillerico T, De Ioannes A, Barros C. Proteolytic activity of rabbit perivitelline spermatozoa. *Zygote* (Cambridge, England). 1999;7(2):143-9.
5. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* (Cambridge, England). 1994;2(4):371-2.
6. Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biology of reproduction*. 2011;85(1):4-5.
7. Zalata A, El-Samanoudy AZ, Shaalan D, El-Baiomy Y, Mostafa T. In Vitro Effect of Cell Phone Radiation on Motility, DNA Fragmentation and Clusterin Gene Expression in Human Sperm. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2015;9(1):129-36.
8. Kim YW, Kim HS, Lee JS, Kim YJ, Lee SK, Seo JN, et al. Effects of 60 Hz 14 microT magnetic field on the apoptosis of testicular germ cell in mice. *Bioelectromagnetics*. 2009;30(1):66-72.
9. Lee JS, Ahn SS, Jung KC, Kim YW, Lee SK. Effects of 60 Hz electromagnetic field exposure on testicular germ cell apoptosis in mice. *Asian journal of andrology*. 2004;6(1):29-34.
10. Al-Akhras MdA, Darmani H, Elbetieha A. Influence of 50 Hz magnetic field on sex hormones and other fertility parameters of adult male rats. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*. 2006;27(2):127-31.
11. Gokcimen A, Özgüner F, Karaoz E, Özen S, Aydın G. The effect of melatonin on morphological changes in liver induced by magnetic field exposure in rats. *Okajimas folia anatomica Japonica*. 2002;79(1):25-31.

12. Hong R, Liu Y, Yu Y, Hu K, Weng E. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields on male reproduction in mice. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi= Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi= Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*. 2003;21(5):342-5.
13. Kim Y, Lee J, Jang I, Choi Y, Kang S, Jung K, et al. Effects of continuous exposure of 60Hz magnetic fields on the mice through the third-generation. *IEEK*. 2001;28:220-33.
14. Berlinguer F, Ledda S, Rosati I, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*. 2003;15(1):19-25.
15. Austin CR, Bishop MW. Some features of the acrosome and perforatorium in mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1958;149(935):234-40.
16. Pineda MH, Dooley MP. *McDonald's veterinary endocrinology and reproduction*. Ames, Iowa: Iowa State Press; 2003.
17. Abou-Haila A, Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2000;379(2):173-82.
18. Cortes CJ, Codelia VA, Manosalva I, de Lange J, De Los Reyes M, Moreno RD. Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal reproduction science*. 2006;93(1-2):165-75.
19. Yao R, Ito C, Natsume Y, Sugitani Y, Yamanaka H, Kuretake S, et al. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(17):11211-6.
20. Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2006;73(11):1430-4.
21. Hafez ESE, Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*: McGraw-hill; 2007.
22. Morton D. Acrosomal enzymes: Immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. 1975;45(2):375-8.

23. Meizel S, Lui CW. Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the hamster sperm acrosome reaction. *Journal of Experimental Zoology*. 1976;195(1):137-44.
24. Meizel S, Mukerji SK. Proacrosin from rabbit epididymal spermatozoa: partial purification and initial biochemical characterization. *Biology of reproduction*. 1975;13(1):83-93.
25. Schleuning W-D, Fritz H. [27] Sperm acrosin. *Methods in enzymology*. 45: Elsevier; 1976. p. 330-42.
26. Zahler WL, Polakoski KL. Benzamidine as an inhibitor of proacrosin activation in bull sperm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 1977;480(2):461-8.
27. Brown CR, Harrison RA. The activation of proacrosin in spermatozoa from ram, bull and boar. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*. 1978;526(1):202-17.
28. Tobias PS, Schumacher GF. Observation of two proacrosins in extracts of human spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*. 1977;74(2):434-9.
29. Brewis I, Clayton R, Barratt C, Hornby D, Moore H. Recombinant human zona pellucida glycoprotein 3 induces calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1996;2(8):583-9.
30. Tanii I, Oh-oka T, Yoshinaga K, Toshimori K. A mouse acrosomal cortical matrix protein, MC41, has ZP2-binding activity and forms a complex with a 75-kDa serine protease. *Developmental biology*. 2001;238(2):332-41.
31. Myles DG, Hyatt H, Primakoff P. Binding of both acrosome-intact and acrosome-reacted guinea pig sperm to the zona pellucida during in vitro fertilization. *Developmental biology*. 1987;121(2):559-67.
32. Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biology of reproduction*. 1996;55(1):80-6.
33. Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Experimental cell research*. 1974;89(1):161-74.

34. Yanagimachi R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Research*. 1982;5(4):323-44.
35. Brewis IA, Morton I, Moore H, England G. Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influx and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2001;60(4):491-7.
36. Bavister BD. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction*. 2002;124(2):181-96.
37. Cross NL, Razy-Faulkner P. Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biology of reproduction*. 1997;56(5):1169-74.
38. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of reproduction*. 1998;59(1):7-11.
39. Benoff S. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular human reproduction*. 1997;3(7):599-637.
40. Del Río MJ, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortés ME, Moreno RD, et al. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*. 2007;5(4):368-73.
41. Schwoebel E, Prasad S, Timmons T, Cook R, Kimura H, Niu E, et al. Isolation and characterization of a full-length cDNA encoding the 55-kDa rabbit zona pellucida protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(11):7214-9.
42. Lefievre L, Conner S, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, et al. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction*. 2004;19(7):1580-6.
43. Wassarman PM. Zona pellucida glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(36):24285-9.
44. Litscher ES, Wassarman PM. Characterization of a mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity in vitro. *Biochemistry*. 1996;35(13):3980-5.

45. Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Developmental biology*. 1988;128(2):376-85.
46. Wassarman P. Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1990(Supplement 42):79-87.
47. Bleil JD, Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell*. 1980;20(3):873-82.
48. Florman HM, Wassarman PM. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*. 1985;41(1):313-24.
49. Wassarman P, Bleil J, Fimiani C, Florman H, Greve J, Kinloch R, et al. The mouse egg receptor for sperm: a multifunctional zona pellucida glycoprotein. *The mammalian egg coat*: Springer; 1989. p. 18-37.
50. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology*. 2001;3(5):499.
51. Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. A profile of fertilization in mammals. *Nature cell biology*. 2001;3(2):E59.
52. Wassarman PM, Litscher ES. Egg's ZP3 structure speaks volumes. *Cell*. 2010;143(3):337-8.
53. Rankin TL, Coleman JS, Epifano O, Hoodbhoy T, Turner SG, Castle PE, et al. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Developmental cell*. 2003;5(1):33-43.
54. Gahlay G, Gauthier L, Baibakov B, Epifano O, Dean J. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science*. 2010;329(5988):216-9.
55. Howes E, Pascall JC, Engel W, Jones R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *Journal of cell science*. 2001;114(22):4127-36.
56. Howes L, Jones R. Interactions between zona pellucida glycoproteins and sperm proacrosin/acrosin during fertilization. *Journal of reproductive immunology*. 2002;53(1-2):181-92.

57. Kerns K, Morales P, Sutovsky P. Regulation of sperm capacitation by the 26S proteasome: an emerging new paradigm in spermatology. *Biology of reproduction*. 2016;94(5):117, 1-9.
58. Wassarman PM. Fertilization in animals. *Developmental genetics*. 1999;25(2):83-6.
59. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. 1999;96(2):175-83.
60. Olivera M, Ruiz T, Tarazona A, Giraldo C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2006;19(4):426-36.
61. Zaneveld L, Kl P, Schumacher G. The proteolytic enzyme systems of mammalian genital tract secretions and spermatozoa 1975. 683-706 p.
62. Stambaugh R, Brackett BG, Mastroianni L. Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. *Biology of reproduction*. 1969;1(3):223-7.
63. McRorie RA, Williams WL. Biochemistry of mammalian fertilization. *Annual review of biochemistry*. 1974;43(1):777-802.
64. Parrish RF, Polakoski KL. Mammalian sperm proacrosin-acrosin system. *International Journal of Biochemistry*. 1979;10(5):391-5.
65. Töpfer-Petersen E, Henschen A. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS letters*. 1987;226(1):38-42.
66. Anakwe OO, Sharma S, Hardy DM, Gerton GL. Guinea pig proacrosin is synthesized principally by round spermatids and contains O-linked as well as N-linked oligosaccharide side chains. *Molecular reproduction and development*. 1991;29(2):172-9.
67. Anakwe OO, Sharma S, Hoff HB, Hardy DM, Gerton GL. Maturation of guinea pig sperm in the epididymis involves the modification of proacrosin oligosaccharide side chains. *Molecular reproduction and development*. 1991;29(3):294-301.
68. Hardy DM, Oda M, Friend DS, Huang T. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochemical Journal*. 1991;275(3):759-66.

69. NagDas SK, Winfrey VP, Olson GE. Identification of hydrolase binding activities of the acrosomal matrix of hamster spermatozoa. *Biology of reproduction*. 1996;55(6):1405-14.
70. NagDas SK, Winfrey VP, Olson GE. Proacrosin-acrosomal matrix binding interactions in ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*. 1996;54(1):111-21.
71. Ho JJ, Meizel S. Electrophoretic detection of multiple forms of trypsin-like activity in spermatozoa of the domestic fowl. *J Reprod Fertil*. 1970;23(1):177-9.
72. Barros C, Newton G, Thatcher W, Drost M, Plante C, Hansen P. The effect of bovine interferon- α 11 on pregnancy rate in heifers. *Journal of animal science*. 1992;70(5):1471-7.
73. Huneau D, Harrison R, Fléchon JE. Ultrastructural localization of proacrosin and acrosin in ram spermatozoa. *Gamete research*. 1984;9(4):425-40.
74. Valdivia M, Yunes R, Melendez J, De Ioannes A, Leyton L, Becker M, et al. Immunolocalization of proacrosin/acrosin in rabbit sperm during acrosome reaction and in spermatozoa recovered from the perivitelline space. *Molecular reproduction and development*. 1994;37(2):216-22.
75. Yunes R, Melendez J, Valdivia M, Barros C. Golden hamster perivitelline spermatozoa do not show proacrosin/acrosin at the inner acrosomal membrane. *Biological research*. 1992;25:91-.
76. Ficsor G, Ginsberg LC, Oldford GM, Snoke RE, Becker RW. Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. *Fertility and sterility*. 1983;39(4):548-52.
77. Honda A, Siruntawineti J, Baba T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm–zona pellucida interactions. *Human reproduction update*. 2002;8(5):405-12.
78. Barros C, Crosby J, Moreno R. Early steps of sperm–egg interactions during mammalian fertilization. *Cell biology international*. 1996;20(1):33-9.
79. Barros C, Crosby JA, Moreno RD. Early steps of sperm–egg interactions during mammalian fertilization. *Cell biology international*. 1996;20(1):33-9.
80. Barros Rodríguez C. Early steps of sperm–egg interactions during mammalian fertilization. 1996.

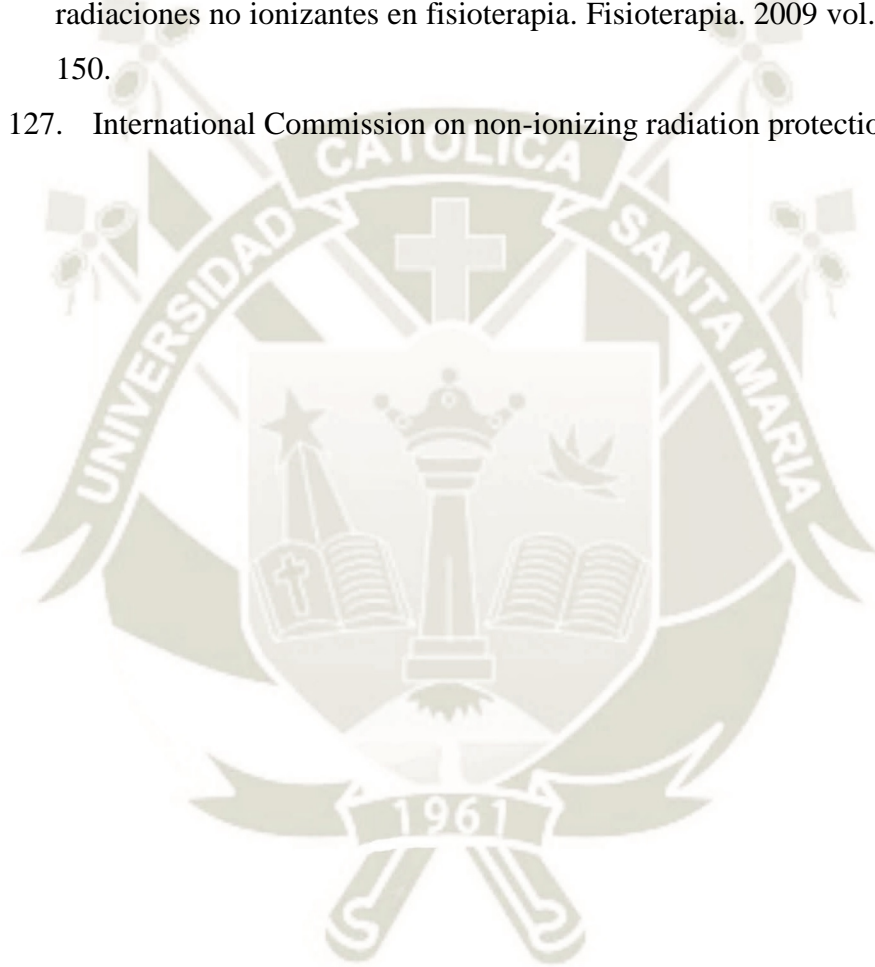
81. Codelia VA, Cortes CJ, Moreno RD. Inhibition of the vacuolar H (+)-pump with bafilomycin A1 does not induce acrosome reaction or activate proacrosin in mouse spermatozoa. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;337(4):1337-44.
82. Maeda T, Tatemoto H, Terada T, Tsutsumi Y. A convenient method for evaluation of frozen-thawed damage to acrosomes of fowl spermatozoa using a gelatin substrate slide. *Japanese poultry science*. 1990;27(1):66-71.
83. Polakoski KL, McRorie RA. Boar acrosin II. Classification, inhibition, and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *Journal of biological chemistry*. 1973;248(23):8183-8.
84. Mann T, Lutwak-Mann C. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. *Male Reproductive Function and Semen*: Springer; 1981. p. 1-37.
85. Yeste M. Boar Spermatozoa Within the Oviductal Environment (III): Fertilisation. *Boar Reproduction*: Springer; 2013. p. 407-67.
86. Yeste M. Boar spermatozoa within the oviductal environment (II): sperm capacitation. *Boar reproduction*: Springer; 2013. p. 347-405.
87. Gaddum P, Blandau RJ. Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes. *Science*. 1970;170(3959):749-51.
88. Gaddum-Rosse P, Blandau RJ. Comparative studies on the proteolysis of fixed gelatin membranes by mammalian sperm acrosomes. *American Journal of Anatomy*. 1972;134(2):133-43.
89. Benitez-Bribiesca L, Velasquez Meza S. Cytochemical demonstration of proteolytic activity of human and rat spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. 1972;29(3):419-NP.
90. Gaddum-Rosse P, Blandau R. Proteolytic activity of guinea pig spermatozoa after induction of the acrosomal reaction in vitro. *American Journal of Anatomy*. 1977;149(3):423-30.
91. Rodríguez Llanos CV. Identificación y evaluación del mecanismo de activación del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides de alpaca (*vicugna pacos*): Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.

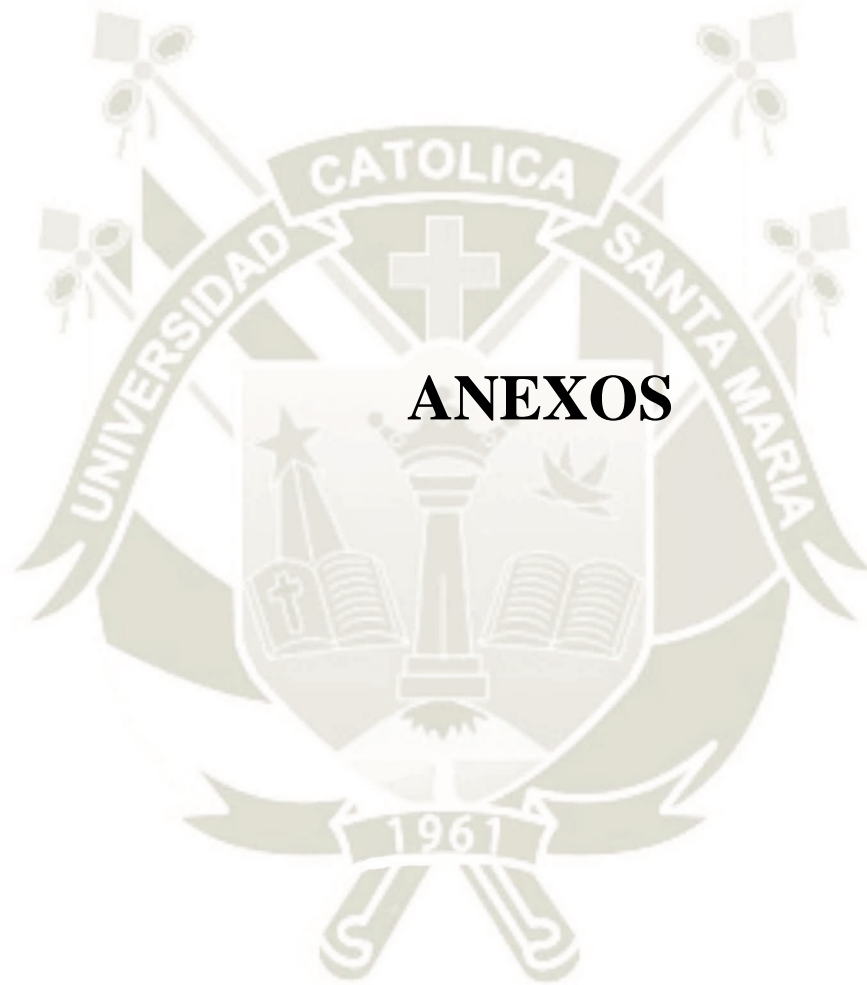
92. Rodrigues Collinet P. Evaluación de la actividad enzimática de acrosina durante la capacitación en espermatozoides congelados de perro. Santiago, Chile: Universidad de Chile- Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuaria; 2009.
93. Deppe M, Risopatrón J, Sánchez R. Trypsin and Chymotrypsin are Involved in the Progesterone-Induced Acrosome Reaction in Canine Spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*. 2010;45(3):453-7.
94. Godoy Muñoz FN. Actividad enzimática de acrosina durante la capacitación espermática, en espermatozoides caninos refrigerados. Santiago, Chile Universidad de Chile; 2010.
95. Rendón I. Arquyma, Arquitectura y Medioambiente [Internet]. España 2013.
96. Cruz Ornetta VM. Gestión Ambiental de la Telefonía Móvil. Lima: INICTEL; 2006.
97. emf-portal [Internet].
98. Informe Mundial sobre el envejecimiento y la salud In: Salud OMdl, editor. Estados Unidos 2015.
99. Osipitel. Organismo Supervisor de la Inversión Privada en Telecomunicaciones. Información estadística de telecomunicaciones Lima 2008
100. Serrano RT. Una visión actual de la infertilidad masculina. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*. 2012;4(3):103-9.
101. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
102. De Kretser D, Baker H. Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(10):3443-50.
103. ICNIRP. For Limiting Exposure To Time-Varying Electric and Magnetic Fields (1Hz – 100 kHz): *Health Physics* 99(6):818-836; 2010
104. Behari J, Rajamani P. Electromagnetic field exposure effects (ELF-EMF and RFR) on fertility and reproduction. *Iniciative Report*. 2012.
105. Adams JA, Galloway TS, Mondal D, Esteves SC, Mathews F. Effect of mobile telephones on sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environment international*. 2014;70:106-12.

106. Akdag MZ, Dasdag S, Aksen F, Isik B, Yilmaz F. Effect of ELF magnetic fields on lipid peroxidation, sperm count, p53, and trace elements. *Medical Science Monitor*. 2006;12(11):BR366-BR71.
107. Iorio R, Delle Monache S, Bennato F, Di Bartolomeo C, Scrimaglio R, Cinque B, et al. Involvement of mitochondrial activity in mediating ELF-EMF stimulatory effect on human sperm motility. *Bioelectromagnetics*. 2011;32(1):15-27.
108. Liu D, Lopata A, Johnston W, Baker H. Human sperm—zona pellucida binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. 1989;4(6):696-701.
109. Liu DY, Baker HG. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertility and Sterility*. 1992;58(6):1178-84.
110. Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Coddington CC, Lombard C, Smith K, et al. Andrology: The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in different and consecutive in-vitro fertilization cycles. *Human Reproduction*. 1993;8(8):1240-4.
111. Ornetta VC, Zúñiga TN, Hernández AV, Herrera AA, Panduro JT, Rupay LL, et al. Diseño e Implementación de un Sistema de Exposición a Campos Magnéticos de Baja Frecuencia para Ratones de Prueba en Estudios Biológicos. *Electrónica-UNMSM*. (30):3-8.
112. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1-2):248-54.
113. Whitaker JR, Bender ML. Kinetics of papain-catalyzed hydrolysis of α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester and α -N-benzoyl-L-argininamide1. *Journal of the American Chemical Society*. 1965;87(12):2728-37.
114. Moreno R, Hoshi M, Barros C. Functional interactions between sulphated polysaccharides and proacrosin: implications in sperm binding and digestion of zona pellucida. *Zygote (Cambridge, England)*. 1999;7(2):105-11.

115. Duan W, Liu C, Wu H, Chen C, Zhang T, Gao P, et al. Effects of exposure to extremely low frequency magnetic fields on spermatogenesis in adult rats. *Bioelectromagnetics*. 2014;35(1):58-69.
116. Kim HS, Park BJ, Jang HJ, Ipper NS, Kim SH, Kim YJ, et al. Continuous exposure to 60 Hz magnetic fields induces duration-and dose-dependent apoptosis of testicular germ cells. *Bioelectromagnetics*. 2014;35(2):100-7.
117. Iorio R, Scrimaglio R, Rantucci E, Monache SD, Di Gaetano A, Finetti N, et al. A preliminary study of oscillating electromagnetic field effects on human spermatozoon motility. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*. 2007;28(1):72-5.
118. Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertility and sterility*. 2008;89(1):124-8.
119. Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, Sabanegh E, et al. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertil Steril*. 2009;92(4):1318-25.
120. Hajhosseini L, Khaki A, Merat E, Ainehchi N. Effect of rosmarinic acid on sertoli cells apoptosis and serum antioxidant levels in rats after exposure to electromagnetic fields. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2013;10(6):477-80.
121. Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free radical biology and medicine*. 2010;48(1):112-9.
122. Ichikawa T, Oeda T, Ohmori H, Schill W. Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa. *International journal of andrology*. 1999;22(1):37-42.
123. Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni S, Comhaire FH, Agarwal A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian journal of andrology*. 2004;6(4):313-8.

124. Bundesamt für Strahlenschutz, BfS. Oficina federal alemana de seguridad radiológica. 1999.
125. Romero Vasquez MA. Predicción de los niveles de radiaciones no ionizantes provenientes de una estación base VHF del servicio móvil marítimo: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017.
126. García, P. Álvarez; Toledo, B. Martínez. Prevención de riesgos frente a radiaciones no ionizantes en fisioterapia. Fisioterapia. 2009 vol. 31, no 4, p. 143-150.
127. International Commission on non-ionizing radiation protection. (Internet).





ANEXO 1. VITALIDAD ESPERMÁTICA

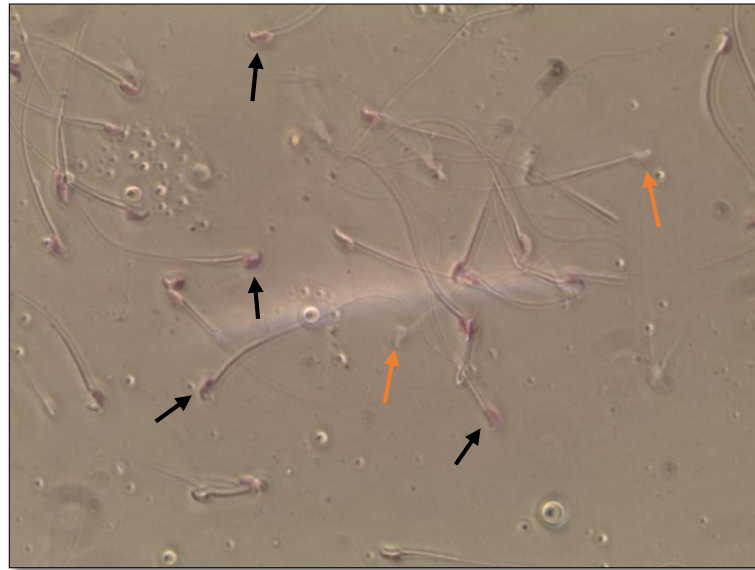


Figura 29. Vitalidad de los espermatozoides. Flechas naranjas señalan los espermatozoides vivos. Flecha negra señalan los espermatozoides muertos (40 X).

ANEXO 2. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA (HOST)

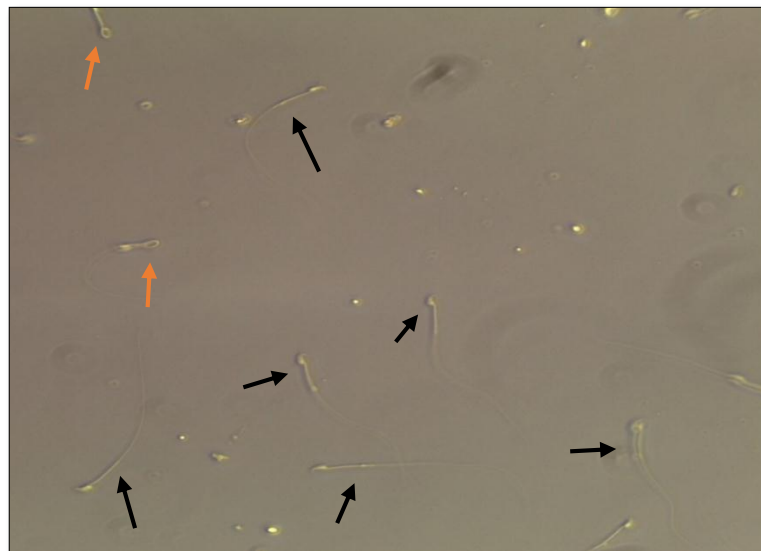


Figura 30. Integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Flechas naranjas señalan los espermatozoides vivos. Flecha negra señalan los espermatozoides muertos (40 X).

ANEXO 3. DATOS COMPLETOS DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

1. MOVILIDAD ESPERMÁTICA DE LOS GRUPOS I, II, III y IV

Movilidad espermática (%)				
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=2	Grupo IV n=2
35 días	21.05	13.3	33.18	20.83
	28.32	13.81	26.91	30.99
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=3	Grupo IV n=3
70 días	14.01	12.32	13.04	12.55
	20	24.17	15.2	10.46
			16.74	10.26

2. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA DE LOS GRUPOS I, II, III y IV

Concentración de espermatozoides (N° de espermatozoides x 10 ⁶ /ml)				
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=2	Grupo IV n=2
35 días	22	33	32	24
	18	38	37	27
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=3	Grupo IV n=3
70 días	55	22	30	25
	40	20	25	16
			26	16

3. VITALIDAD ESPERMÁTICA DE LOS GRUPOS I, II, III y IV

Vitalidad espermática (%)				
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=2	Grupo IV n=2
35 días	10	10	18.3	11
	9.9	8.13	21.28	7.56
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=3	Grupo IV n=3
70 días	5.21	8.14	4.19	9.77
	5.66	11.11	12.5	7.5
			8.42	9.57

4. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA (HOST) ESPERMÁTICA DE LOS GRUPOS I, II, III y IV

Integridad de la membrana espermática (%)				
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=2	Grupo IV n=2
35 días	8.5	18.88	9.68	16.13
	7.77	16.5	14.41	16.36
Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=3	Grupo IV n=3
70 días	10.78	25	16.59	13.81
	9.8	5.45	8.91	20
			4.86	20.16

ANEXO 4. DATOS DE LA MEDIA Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

Movilidad espermática (%)					
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
35 días	Media	24.685	13.555	30.045	25.91
	N	2	2	2	2
	Desviación estándar	5.140666299	0.360624458	4.433559518	7.184204897
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
70 días	Media	10.29	15.225	10.12	17.99
	N	2	2	3	3
	Desviación estándar	0.692964646	13.82393757	5.957877139	3.620870061

Concentración de espermatozoides (N° de espermatozoides x 10 ⁶ /ml)					
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
35 días	Media	20	35.5	34.5	25.5
	N	2	2	2	2
	Desviación estándar	2.828427125	3.535533906	3.535533906	2.121320344
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
70 días	Media	47.50	21.00	27.00	19.00
	N	2	2	3	3
	Desviación estándar	10.60660172	1.414213562	2.645751311	5.196152423

Vitalidad espermática (%)					
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
35 días	Media	9.95	9.065	19.79	9.28
	N	2	2	2	2
	Desviación estándar	0.070710678	1.322289681	2.107178208	2.432447327
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
70 días	Media	5.435	9.625	8.37	8.947
	N	2	2	3	3
	Desviación estándar	0.318198052	2.10010714	4.155225626	1.256834648

Integridad de la membrana espermática (%)					
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
35 días	Media	8.135	17.69	12.045	16.245
	N	2	2	2	2
	Desviación estándar	0.51618795	1.682914139	3.344615075	0.16263456
Tiempo de exposición		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
70 días	Media	10.29	15.225	10.12	17.99
	N	2	2	3	3
	Desviación estándar	0.692964646	13.82393757	5.957877139	3.620870061

ANEXO 5. DATOS DE LA MEDIA Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS HALOS DE DIGESTIÓN EN LOS GRUPOS I, II, II Y IV.

Estadísticos

Tratamientos	Tiempo de exposición		Tratamientos	Diámetro del halo (um)	Tiempo de exposición		
grupo I	35 días	N	Válido	101	101	101	
			Perdidos	0	0	0	
			Media	1.00	16.7597	35.00	
			Mediana	1.00	16.3200	35.00	
			Moda	1	13.69 ^a	35	
			Desviación estándar	.000	3.19238	.000	
			Varianza	.000	10.191	.000	
			Mínimo	1	10.86	35	
			Máximo	1	25.89	35	
		70 días	N	Válido	179	179	179
				Perdidos	0	0	0
				Media	1.00	8.9293	70.00
				Mediana	1.00	8.8000	70.00
				Moda	1	8.80	70
			Desviación estándar	.000	1.79868	.000	
			Varianza	.000	3.235	.000	
		Mínimo	1	5.13	70		
		Máximo	1	13.98	70		
grupo II	35 días	N	Válido	139	139	139	
			Perdidos	0	0	0	
			Media	2.00	9.7624	35.00	
		Mediana	2.00	9.7300	35.00		

		Moda	2	10.27	35	
		Desviación estándar	.000	2.13494	.000	
		Varianza	.000	4.558	.000	
		Mínimo	2	5.78	35	
		Máximo	2	15.77	35	
70 días	N	Válido	125	125	125	
		Perdidos	0	0	0	
		Media	2.00	9.1490	70.00	
		Mediana	2.00	8.9700	70.00	
		Moda	2	8.82 ^a	70	
		Desviación estándar	.000	1.85239	.000	
		Varianza	.000	3.431	.000	
		Mínimo	2	6.18	70	
		Máximo	2	14.94	70	
	grupo III	35 días	N	Válido	114	114
				Perdidos	0	0
			Media	3.00	5.2865	35.00
		Mediana	3.00	4.9300	35.00	
		Moda	3	4.49	35	
		Desviación estándar	.000	1.60196	.000	
		Varianza	.000	2.566	.000	
		Mínimo	3	2.35	35	
		Máximo	3	10.97	35	
70 días		N	Válido	48	48	48
			Perdidos	0	0	0
			Media	3.00	12.7265	70.00
		Mediana	3.00	13.4500	70.00	
		Moda	3	13.45	70	

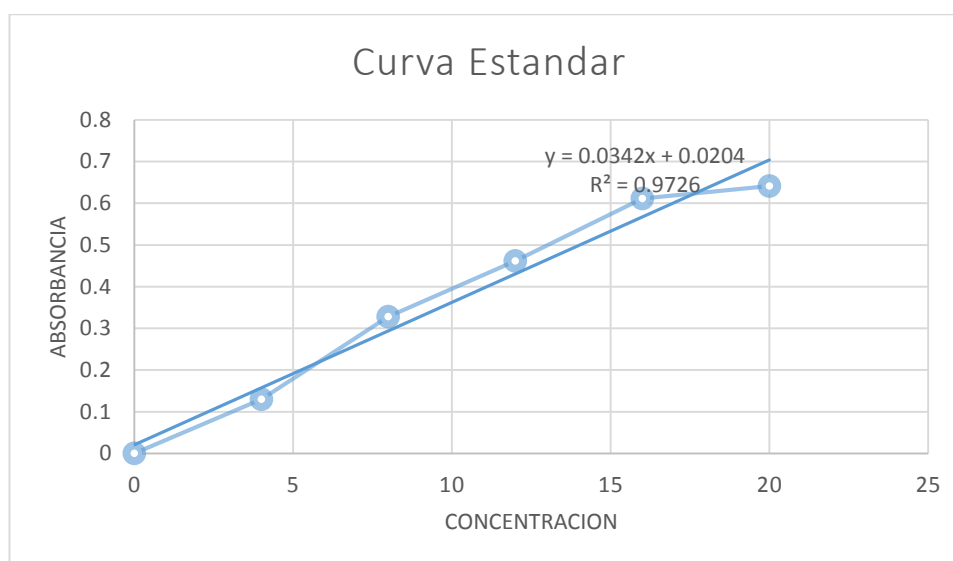
		Desviación estándar		.000	3.39166	.000	
		Varianza		.000	11.503	.000	
		Mínimo		3	6.14	70	
		Máximo		3	21.05	70	
grupo IV	35 días	N	Válido	8	8	8	
			Perdidos	0	0	0	
			Media	4.00	12.2438	35.00	
			Mediana	4.00	11.3100	35.00	
			Moda	4	6.55 ^a	35	
			Desviación estándar	.000	4.32426	.000	
			Varianza	.000	18.699	.000	
			Mínimo	4	6.55	35	
			Máximo	4	20.83	35	
		70 días	N	Válido	151	151	151
				Perdidos	0	0	0
				Media	4.00	10.2200	70.00
				Mediana	4.00	10.0900	70.00
			Moda	4	9.20 ^a	70	
			Desviación estándar	.000	1.87238	.000	
			Varianza	.000	3.506	.000	
			Mínimo	4	6.49	70	
		Máximo	4	15.34	70		

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

ANEXO 6. DATOS COMPLETOS DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR (BAEE).

1. Construcción de la curva de calibración por el método de Bradford.

	TUBOS					
	B	1	2	3	4	5
Concentración BSA		4 ug/ml	8 ug/ml	12 ug/ml	16 ug/ml	20 ug/ml
BSA 0.1 mg/ml	-	40 ul	80 ul	120 ul	160 ul	200 ul
Agua destilada	200 ul	160 ul	120 ul	80 ul	40 ul	-
Rvo. de Bradford	1800 ul	1800 ul	1800 ul	1800 ul	1800 ul	1800 ul
Absorbancia	-	0.13	0.328	0.462	0.611	0.641



Ecuación de la recta: $y = 0,0342x + 0,0204$

2. Datos de la absorbancia de la concentración proteica.

Tiempo de exposición	Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia	
35 días	Grupo I	0.0018	0.106	
		0.0050	0.303	
	Grupo II	0.0010	0.093	
		0.0016	0.226	
	Grupo III	0.0030	0.224	
		0.0032	0.361	
	Grupo IV	0.0074	0.399	
		0.0021	0.163	
	70 días	Grupo I	0.0006	0.09
			0.0017	0.166
		Grupo II	0.0011	0.07
			0.0010	0.063
Grupo III		0.16	0.0022	
		0.187	0.0031	
Grupo IV		0.13	0.0020	
		0.092	0.0013	
Grupo IV		0.135	0.0034	
		0.139	0.0035	

3. Datos de la absorbancia mediante espectrofotometría con BAEE.

Tiempo de exposición	Muestra	U (μmol BAEE/ml/ mg)	Absorbancia
35 días	Grupo I	0.9116	1.570
		0.5056	1.603
	Grupo II	0.7115	1.559
		0.3422	1.577
	Grupo III	0.2756	1.642
		0.1895	1.607
	Grupo IV	0.1872	1.556
		0.5302	1.592
70 días	Grupo I	0.2833	1.459
		0.4167	1.509
	Grupo II	1.4379	1.435
		1.8493	1.441
	Grupo III	0.3765	1.442
		0.3783	1.441
	Grupo IV	0.5487	1.430
		0.8808	1.442
		0.8658	1.452
		0.8326	1.445

ANEXO 7. DATOS DE LA MEDIA Y LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR (BAEE) EN LOS GRUPOS I, II, II Y IV.

Estadísticos

μmol BAEE/min/mg

35 días	grupo I	N	Válido	2
			Perdidos	0
		Media	.708610	
		Mediana	.708610	
		Moda	.5056 ^a	
		Desviación estándar	.2870854	
		Varianza	.082	
		Mínimo	.5056	
		Máximo	.9116	
		grupo II	N	Válido
			Perdidos	0
		Media	.526885	
		Mediana	.526885	
		Moda	.3422 ^a	
		Desviación estándar	.2611416	
		Varianza	.068	
		Mínimo	.3422	
		Máximo	.7115	
grupo III		N	Válido	2
	Perdidos		0	
		Media	.232555	
		Mediana	.232555	
		Moda	.1895 ^a	
	Desviación estándar	.0608607		

		Varianza	.004
		Mínimo	.1895
		Máximo	.2756
grupo IV	N	Válido	2
		Perdidos	0
		Media	.358735
		Mediana	.358735
		Moda	.1873 ^a
		Desviación estándar	.2425164
		Varianza	.059
		Mínimo	.1873
		Máximo	.5302
	70 días grupo I	N	Válido
Perdidos			0
		Media	2.054988
		Mediana	2.054988
		Moda	.2833 ^a
		Desviación estándar	2.5055452
		Varianza	6.278
		Mínimo	.2833
		Máximo	3.8267
grupo II		N	Válido
	Perdidos		0
		Media	.927300
		Mediana	.927300
		Moda	.4167 ^a
		Desviación estándar	.7220974
		Varianza	.521
		Mínimo	.4167

		Máximo	1.4379
grupo III	N	Válido	3
		Perdidos	0
		Media	.868033
		Mediana	.378300
		Moda	.3765 ^a
		Desviación estándar	.8498023
		Varianza	.722
		Mínimo	.3765
		Máximo	1.8493
grupo IV	N	Válido	3
		Perdidos	0
		Media	.765100
		Mediana	.865800
		Moda	.5487 ^a
		Desviación estándar	.1875579
		Varianza	.035
		Mínimo	.5487
		Máximo	.8808

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

ANEXO 8. DATOS ESTADÍSTICOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE DIGESTIÓN USANDO LA PRUEBA DE ANOVA

Tabla de ANOVA

Tiempo de exposición				Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
35 días	Diámetro del halo (um) Tratamientos	Entre grupos	(Combinado)	7149.025	3	2383.008	412.332	.000
		Dentro de grupos		2069.007	358	5.779		
		Total		9218.031	361			
70 días	Diámetro del halo (um) Tratamientos	Entre grupos	(Combinado)	624.170	3	208.057	50.206	.000
		Dentro de grupos		2067.891	499	4.144		
		Total		2692.061	502			

ANEXO 9. RESUMEN DE DATOS DE LOS GRUPOS II, III Y IV RESPECTO AL GRUPO I.

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS						
Tiempo de exposición		Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=2	Grupo IV n=2	Valor de P
35 días	Movilidad espermática (%)	24.69 ± 5.14	13.55 ± 0.36	30.05 ± 4.43	25.91 ± 7.18	Grupo II: p>0.05 Grupo III: p>0.05 Grupo IV: p>0.05
	Concentración (Nº de	20 ± 2.83	35.5 ± 3.54	34.5 ± 3.54	25.5 ± 2.12	Grupo II: p<0.05

	espermatozoides x 10⁶/ml)					Grupo III: p<0.05 Grupo IV: p>0.05
	Vitalidad espermática (%)	9.95 ± 0.07	9.07 ± 1.32	19.79 ± 2.11	9.28 ± 2.43	Grupo II: p>0.05 Grupo III: p<0.05 Grupo IV: p>0.05
	Integridad de la membrana espermática (%)	8.14 ± 0.52	17.69 ± 1.68	12.05 ± 3.34	16.25 ± 0.16	Grupo II: p<0.05 Grupo III: p>0.05 Grupo IV: p<0.05
	Tiempo de exposición	Grupo I n=2	Grupo II n=2	Grupo III n=3	Grupo IV n=3	
70 días	Movilidad espermática (%)	17.01 ± 4.24	18.25 ± 8.38	14.99 ± 1.86	11.09 ± 1.27	Grupo II: p>0.05 Grupo III: p>0.05 Grupo IV: p>0.05
	Concentración (N° de espermatozoides x 10⁶/ml)	47.5± 1.,60	21 ± 1.41	27 ± 2.65	19 ± 5.20	Grupo II: p>0.05 Grupo III: p<0.05 Grupo IV: p<0.05

Vitalidad espermática (%)	5.44 ± 0.32	9.63 ± 2.1	8.37 ± 4.16	8.95 ± 1.26	Grupo II: p>0.05 Grupo III: p>0.05 Grupo IV: p<0.05
Integridad de la membrana espermática (%)	10.29 ± 0.69	15.23 ± 13.82	10.12 ± 5.96	17.99 ± 3.62	Grupo II: p>0.05 Grupo III: p>0.05 Grupo IV: p>0.05

ANEXO 10. RESUMEN DE DATOS DE LOS GRUPOS I, II, III Y IV DE LOS HALOS DE DIGESTIÓN

Informe

Diámetro del halo (um)

Tratamientos	Tiempo de exposición	Media	N	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Varianza
grupo I	35 días	16.7597	101	3.19238	10.86	25.89	10.191
	70 días	8.9293	179	1.79868	5.13	13.98	3.235
	Total	11.7539	280	4.46169	5.13	25.89	19.907
grupo II	35 días	9.7624	139	2.13494	5.78	15.77	4.558
	70 días	9.1490	125	1.85239	6.18	14.94	3.431
	Total	9.4720	264	2.02573	5.78	15.77	4.104
grupo III	35 días	5.2865	114	1.60196	2.35	10.97	2.566
	70 días	12.7265	48	3.39166	6.14	21.05	11.503
	Total	7.4909	162	4.09541	2.35	21.05	16.772
grupo IV	35 días	12.2437	8	4.32426	6.55	20.83	18.699
	70 días	10.2200	151	1.87238	6.49	15.34	3.506

	Total	10.3218	159	2.08655	6.49	20.83	4.354
Total	35 días	10.3600	362	5.05319	2.35	25.89	25.535
	70 días	9.7337	503	2.31574	5.13	21.05	5.363
	Total	9.9958	865	3.72564	2.35	25.89	13.880

ANEXO 11. DATOS ESTADÍSTICOS DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO LA PRUEBA T SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES EN LOS GRUPOS I, II, III Y IV A LOS 35 DÍAS DE EXPOSICIÓN.

*** Los datos obtenidos se consideraron como una distribución normal por la cantidad de datos obtenidos de cada grupo.**

	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo II</i>
Media	0.708611277	0.52688206
Varianza	0.082416728	0.068196331
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0.07530653	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.662229372	
P(T<=t) una cola	0.287962433	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.575924866	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	
	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo III</i>
Media	0.708611277	0.232554567
Varianza	0.082416728	0.003704526
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0.043060627	
Diferencia hipotética de las medias	0	

Grados de libertad	2
Estadístico t	2.294132601
P(T<=t) una cola	0.074372998
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558
P(T<=t) dos colas	0.148745997
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273

	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo IV</i>
Media	0.708611277	0.358734927
Varianza	0.082416728	0.058814658
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0.070615693	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1.316630692	
P(T<=t) una cola	0.159297792	
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558	
P(T<=t) dos colas	0.318595583	
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273	

ANEXO 12. DATOS ESTADÍSTICOS DE LA HIDRÓLISIS DE ÉSTER DE BAJO PESO MOLECULAR USANDO LA PRUEBA T SUPONIENDO VARIANZAS IGUALES EN LOS GRUPOS I, II, III Y IV A LOS 70 DÍAS DE EXPOSICIÓN.

	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo II</i>
Media	0.35002188	1.64356083
Varianza	0.00890152	0.08462071
Observaciones	2	2
Varianza agrupada	0.046761114	
Diferencia hipotética de las medias	0	

Grados de libertad	2
Estadístico t	-5.981871608
P(T<=t) una cola	0.01341346
Valor crítico de t (una cola)	2.91998558
P(T<=t) dos colas	0.02682692
Valor crítico de t (dos colas)	4.30265273

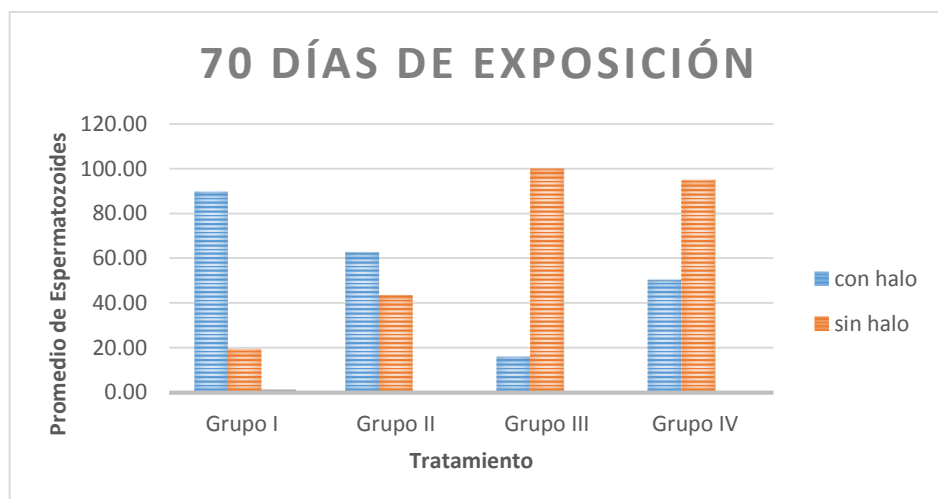
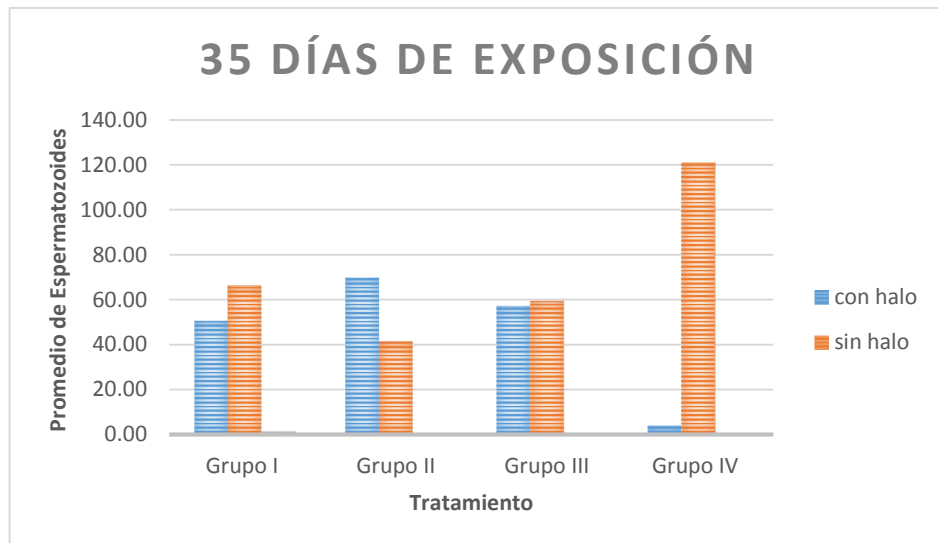
	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo III</i>
Media	0.35002188	0.43448038
Varianza	0.00890152	0.00978252
Observaciones	2	3
Varianza agrupada	0.009488855	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-0.949788877	
P(T<=t) una cola	0.206144894	
Valor crítico de t (una cola)	2.353363435	
P(T<=t) dos colas	0.412289787	
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305	

	<i>Grupo I</i>	<i>Grupo IV</i>
Media	0.35002188	0.85975221
Varianza	0.00890152	0.00060896
Observaciones	2	3
Varianza agrupada	0.00337315	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	-9.614202979	
P(T<=t) una cola	0.001194098	

Valor crítico de t (una cola)	2.353363435
P(T<=t) dos colas	0.002388195
Valor crítico de t (dos colas)	3.182446305

ANEXO 13. DATOS COMPLETOS DE LA CANTIDAD DE ESPERMATOZOIDES CON Y SIN HALOS DE DIGESTIÓN.

Periodo de exposición a Campo Magnético	Tratamientos	con halo	sin halo
35 días	Grupo I	44	69
		57	64
	Grupo II	69	49
		70	34
	Grupo III	71	50
		43	69
	Grupo IV	0	121
		8	121
70 días	Grupo I	87	13
		92	26
	Grupo II	58	43
		67	44
	Grupo III	0	121
		6	111
		42	68
	Grupo IV	10	91
	102	80	
	39	114	



ANEXO 14. MARCO NORMATIVO NACIONAL

- Constitución Política del Perú (Arts. 2°, 7°, 66° y 67°).

Se establece la obligación del Estado de determinar la política nacional del ambiente, de modo tal que se garantice el derecho de las personas a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de sus vidas y se protege su salud, la de su medio familiar y comunidad en su conjunto.

- Ley General del Ambiente. Ley N° 28611. Se establece los principios y normas básicas que aseguren el efectivo ejercicio del derecho a un ambiente saludable, equilibrado y adecuado.

ANEXO 15. DERECHOS CONSTITUCIONALES DEL MEDIO AMBIENTE

- Constitución Política del Perú (Arts. 2°, 7°, 66° y 67°). Se establece la obligación del Estado de determinar la política nacional del ambiente, de modo tal que se garantice el derecho de las personas a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado al desarrollo de sus vidas y se protege su salud, la de su medio familiar y comunidad en su conjunto.
- Ley General del Ambiente. Ley N° 28611. Se establece los principios y normas básicas que aseguren el efectivo ejercicio del derecho a un ambiente saludable, equilibrado y adecuado.
- Ley Marco del Sistema de Medio Ambiental, Ley N° 28245 (literal k del Art. 5. – Principio Precautorio). Se establece que la gestión ambiental en el país se rige, entre otros, por el Principio Precautorio, indicando que: “La ausencia de certeza científica no debe utilizarse como razón para no adoptar o postergar la ejecución de medidas eficaces y eficientes destinadas a evitar y reducir dicho peligro”

ANEXO 16. MARCO NORMATIVO DE LOS NIVELES DE EXPOSICIÓN DE RADIACIÓN IONIZANTE.

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE RADIACIÓN IONIZANTE

En el Perú se adoptó la recomendación por el ICNIRP para el rango de frecuencias entre 9kHz y 300 GHz, mediante el decreto supremo N° 038-2003-MTC del Ministerio de Transportes y comunicaciones, modificado con el decreto supremo N° 038-2006-MTC del Ministerio de Transportes y comunicaciones, se establecen los límites máximos permisibles para la radiación no ionizante de telecomunicaciones.

Se tomó en cuenta la Recomendación K-52 de la unidad internacional de telecomunicaciones (UIT), adoptándose los valores establecidos como niveles de referencia por la ICNIRP.

NIVELES DE EXPOSICIÓN EN GENERAL

(D.S. N° 038-2003-MTC)

	Rango de frecuencias	Intensidad de campo eléctrico	Intensidad de campo magnético	Densidad de Potencia
		(V/m)	(A/m)	(W/m ²)
OCUPACIONAL	9 – 65 KHz	610	24.4	-
	0.065 – 1 MHz	610	1.6 / f	-
	1 – 10 MHz	610 / f	1.6 / f	-
	10 – 400 MHz	61	0.16	10
	400 – 2000 MHz	3 f ^{0.5}	0.008 f ^{0.5}	f / 40
	2 – 300 GHz	137	0.36	50
	Rango de frecuencias	Intensidad de campo eléctrico	Intensidad de campo magnético	Densidad de Potencia
		(V/m)	(A/m)	(W/m ²)
POBLACIONAL	9 – 150 KHz	87	5	-
	0.15 – 1 MHz	87	0.73/f	-
	1 – 10 MHz	87/ f ^{0.5}	0.73/f	-
	10 – 400 MHz	28	0.073	2
	400 – 2000 MHz	1.375 f ^{0.5}	0.0037 f ^{0.5}	f / 200
	2 – 300 GHz	61	0.16	10

TABLA 2. NIVELES DE EXPOSICIÓN EN ÁREAS DE USO PÚBLICO (R.M. N° 120-2005-MTC/03). ÁREAS DE USO PÚBLICO COMO COLEGIOS (INICIAL, PRIMARIA, SECUNDARIA), HOSPITALES, CENTROS DE SALUD Y CLÍNICAS.

Rango de frecuencias	Intensidad de campo eléctrico	Densidad de Potencia
	(V/m)	(W/m ²)
9 – 150 KHz	61,5	-
0.15 – 1 MHz	61,5	-
1 – 10 MHz	$61,5 / f^{0.5}$	-
10 – 400 MHz	20	1
400 – 2000 MHz	$0,972 f^{0.5}$	$f / 400$
2 – 300 GHz	43,1	5

ANEXO 17. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ROJO PONCEAU 0,1 %

Reactivo	Concentración
Ácido acético glacial	15 %
Metanol	40 %
Ponceau	0,25 %
Agua destilada	Aforar a 100 ml