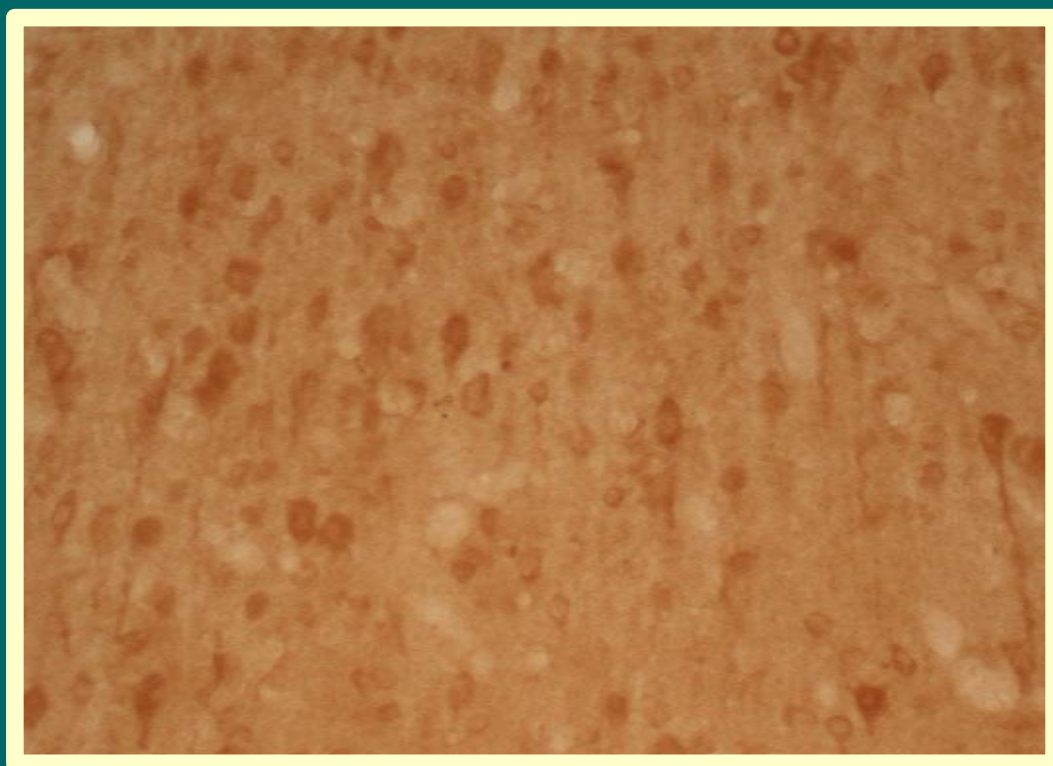




*Universidad de Santiago de Compostela
Departamento de Ciencias Morfológicas
Facultad de Medicina*

ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE MARCADORES DE ESTRES A NIVEL CORTICAL Y SUBCORTICAL EN EL CEREBRO DE RATA EXPUESTA A RADIACIÓN DE 2,45 GHZ



Maria Teresa Forge Mora

Santiago de Compostela, Abril 2009

Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Morfológicas

**ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE
MARCADORES DE ESTRÉS A NIVEL
CORTICAL Y SUBCORTICAL EN EL
CEREBRO DE RATA EXPUESTA A
RADIACIÓN DE 2,45 GHz**

TESIS DOCTORAL

María Teresa Jorge Mora

Santiago de Compostela, Abril 2009

Foto portada: Expresión inmunohistoquímica de la proteína del choque térmico, Hsp90, a nivel de la corteza parietal de rata expuesta con radiofrecuencia a 2,45 GHz a potencia de 12 w.

Imprime y maqueta:

**ANÁLISIS EXPERIMENTAL DE
MARCADORES DE ESTRÉS A NIVEL
CORTICAL Y SUBCORTICAL EN EL
CEREBRO DE RATA EXPUESTA A
RADIACIÓN DE 2,45 GHz**

Tesis Doctoral presentada por
María Teresa Jorge Mora

Directora:

María Elena López Martín

Departamento de Ciencias Morfológicas

Universidad de Santiago de Compostela

Santiago, Abril 2009

Dña María Elena López Martín, Contratada Doctora de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

HACE CONSTAR QUE:

Dña María Teresa Jorge Mora ha realizado bajo mi dirección el trabajo de su Tesis Doctoral, *“Análisis experimental de marcadores de estrés a nivel cortical y subcortical en el cerebro de rata expuesta a radiación de 2,45 GHz”*, y que dicho trabajo reúne todas las condiciones necesarias para ser presentado para su valoración por la comisión correspondiente.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Santiago de Compostela, a 1 de Abril de 2009.

Prof. Dña María Elena López Martín.

*"Lo más bello que podemos experimentar
es el misterio de las cosas"
Albert Einstein (1879-1955)*

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a mi Directora de Tesis, la Profesora D^{ña} M^a Elena López Martín, quien no solo llevó a cabo la dirección de éste trabajo experimental sino que también supo darme su apoyo y dedicación a lo largo de estos años. Gracias por la confianza que depositaste en mí al proponerme esta Tesis y por saber transmitir tu admiración por el conocimiento y tu afán por la investigación.

A mi padre. Gracias por estar conmigo en todo momento, por tus buenos consejos, por tu cariño y por ser un estímulo constante a lo largo de mi vida.

A todos los compañeros del Departamento de Ciencias Morfológicas, que siempre me han acogido y me han brindado su apoyo de manera incondicional.

A Julio Bregáins, Eva Domínguez, Eva García, José Carlos Santos y Rafael Fuentes, cuya ayuda ha sido fundamental en la elaboración de la parte experimental de este trabajo.

Al Departamento de Física Aplicada, área de electromagnetismo, y en especial a los profesores Don Eduardo Moreno Piquero y Don Francisco Ares Pena por su inestimable colaboración en este estudio de bioelectromagnetismo.

A M^a José Misa, compañera de residencia y doctorado, porque nuestros caminos han ido paralelos y nos han hecho compartir muchas experiencias a lo largo de estos años.

A mi marido Jorge y a mi hijo Alejandro, por su inagotable paciencia y porque con su cariño día a día me han dado fuerzas para finalizar este trabajo.

A mi madre, por estar siempre a mi lado, y a toda mi familia, por su apoyo e interés constante a lo largo del desarrollo de esta Tesis.

Deseo expresar mi agradecimiento a todos mis amigos y compañeros que en distintos momentos me han aportado su consejo y ayuda.

Finalmente desearía expresar mi agradecimiento a la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia que ha financiado esta investigación con los siguientes proyectos INCITE07PXI206061ES y INCITE08E1R206032ES

ÍNDICE

I. INTRODUCCION GENERAL

I.1 CONTAMINACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.....	
I.2 GENERALIDADES SOBRE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.....	
I.2.1 Naturaleza y propiedades de los campos electromagnéticos.....	
I.2.2 Espectro de las ondas electromagnéticas.....	
I.2.3 Cuantificación del campo electromagnético en el tejido irradiado. Cálculo de SAR.....	
I.2.4 Normativa relativa a los campos electromagnéticos.....	
I.2.5 Límites de exposición de los campos electromagnéticos.....	
I.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS.....	
I.3.1 Clasificación general de los efectos biológicos.....	
I.3.2 Empleo de sistemas de radiación.....	
I.3.3. Investigación de los efectos de los campos electromagnéticos en los seres vivos (animales y humanos). Efectos sobre el sistema nervioso central (SNC)	
I.3.3.1 Alteraciones en el electroencefalograma.....	
I.3.3.2 Efectos sobre el comportamiento	
I.3.3.3 Efectos sobre la barrera hematoencefálica.....	
I.3.3.4 Efectos morfológicos a nivel del SNC.....	
I.4 APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LA RADIACIÓN MICROONDA EN MEDICINA FÍSICA Y REHABILITACIÓN.....	
I.4.1 Diatermia electromagnética	
I.4.2 Mecanismo de producción. Aparatos de microondas.....	
I.4.3 Bases físicas de la terapéutica por microondas.....	
I.4.4 Dosificación de la microonda.....	
I.4.7 Efectos fisiológicos derivados de la aplicación de la diatermia por microonda.....	
I.4.8 Indicaciones de la aplicación de la terapéutica por microonda en Medicina Física y Rehabilitación.....	
I.4.8 Contraindicaciones de la aplicación de la terapéutica por microonda en Medicina Física y Rehabilitación.....	
I.5 REGULACIÓN DE TEMPERATURA EN LOS SERES VIVOS.....	
I.5.1 Temperatura corporal normal.....	
I.5.2 Mecanismos de termorregulación.....	

<p>I.6 ESTUDIO DE PARÁMETROS DE MEDIDA DE EFECTOS BIOLÓGICOS DE RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS.....</p> <p> I.6.1 Determinación experimental de dosimetría (SAR) en sistemas de radiación.....</p> <p> I.6.2 Marcadores de daño celular en tejidos biológicos.....</p> <p> I.6.2.1 Proteínas del shock térmico.....</p> <p> I.6.2.1.1 Clasificación de las proteínas del choque térmico..</p> <p> I.6.2.1.2 Hsp90.....</p> <p> I.6.2.1.2.1 Expresión de Hsp90 en el tejido cerebral en condiciones normales y de estrés.....</p> <p> I.6.2.2 c-Fos.....</p>	
<p><u>II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS</u>.....</p> <p> II.1 JUSTIFICACIÓN.....</p> <p> II. 2 OBJETIVOS.....</p>	
<p><u>III. MATERIAL Y METODOS</u></p> <p> III.1 ANIMALES.....</p> <p> III.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....</p> <p> III.3 RADIACIÓN CON MICROONDAS EN CAVIDAD EXPERIMENTAL (GTEM). CÁLCULO DE SAR.....</p> <p> III.3.1 Descripción del sistema experimental de radiación.....</p> <p> III.3.2 Descripción de las simulaciones y cálculo del SAR mediante SEMCAD.....</p> <p> III.4 ESTUDIO DE LA DETERMINACIÓN TÉRMICA EXPERIMENTAL DURANTE LA RADIACIÓN PARA EL CÁLCULO DEL SAR Y ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ESTRÉS.....</p> <p> III.4.1 Estimación del valor de SAR mediante medidas de temperatura rectal.....</p> <p> III.4.2 Estimación de los niveles de estrés mediante medidas de temperatura rectal.....</p> <p> III.5 TÉCNICA GENERAL DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....</p> <p> III.5.1 Extracción de tejido.....</p> <p> III.5.2 ELISA.....</p> <p> III.5.3 Western Blot (WB).....</p> <p> III.6 TÉCNICAS GENERALES DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....</p> <p> III.6.1 Perfusión y procesamiento de tejido.....</p>	

<p>III.6.2 Técnicas de tinción de Azul de Toluidina.....</p> <p>III.6.3 Inmunohistoquímica.....</p> <p> III.6.3.1 Anticuerpos primarios y secundarios.....</p> <p> III.6.3.2 Técnicas generales de inmunohistoquímica simple</p> <p>III.7 CUANTIFICACIÓN Y ESTADÍSTICA.....</p>	
<p>IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>.....</p> <p>IV.1 EXPERIMENTO 1</p> <p> IV.1.2. Introducción.....</p> <p> IV.1.3. Resultados de SAR.....</p> <p> IV.1.4. Niveles de HSP-90 determinados mediante ELISA.....</p> <p> IV.1.5 Distribución de HSP-90 en inmunohistoquímica.....</p> <p> IV.1.6 Discusión.....</p> <p>IV 2. EXPERIMENTO 2</p> <p> IV.2.1 Introducción.....</p> <p> IV.2.2. Tasa de absorción específica (SAR) obtenidos por temperatura rectal T°.....</p> <p> IV.2.3 Comportamiento de la temperatura rectal postexposición: niveles de estrés.....</p> <p> IV.2.4 Resultados de morfología.....</p> <p> IV.2.4.1 En exposiciones agudas.....</p> <p> IV.2.4.2 Comparación de la activación neuronal de c-fos entre exposiciones agudas y exposiciones repetidas.....</p> <p> IV.2.5 Discusión.....</p>	
<p>V. <u>DISCUSION GENERAL</u>.....</p> <p>VI.1 REGIONES ANATÓMICAS A ESTUDIO. VÍAS DE PROPAGACIÓN DE LOS CEM.....</p> <p>VI.2 MARCADORES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA RADIACIÓN NO IONIZANTE: HSP90 Y C-FOS. MÉTODOS DE CÁLCULO DEL SAR.....</p>	
<p>VI. <u>CONCLUSIONES</u>.....</p>	
<p>VII. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>.....</p>	
<p>VIII. <u>APÉNDICE</u>.....</p>	

I.INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. CONTAMINACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La interacción de las corrientes electromagnéticas con el cuerpo humano es un hecho que ocurre desde nuestros orígenes, pero que ha crecido exponencialmente en los últimos años debido a la gran explosión del sector científico y tecnológico. Hoy en día, son innumerables los campos electromagnéticos (CEM) que nos rodean, debido al desarrollo de fuentes de CEM generados por el hombre. La aparición de diversos aparatos de uso doméstico relacionados con avances tecnológicos que se encuentran formando parte de nuestra vida cotidiana, hace que se haya incrementado enormemente la exposición de los seres humanos a este tipo de radiación. Pero el continuo aumento en la exposición a CEM aunque acrecenta la importancia del conocimiento sobre los posibles efectos de la interacción de este tipo de radiación y los seres vivos, todavía estamos muy lejos de tener un conocimiento claro de los posibles efectos perjudiciales que estos puedan tener.

En este sentido, la publicación de estudios que asociaron la posible relación de los CEM con efectos adversos para la salud ha hecho saltar la alarma de múltiples sectores poblacionales. Esta preocupación también se ha extendido al campo de la medicina, en donde el avance tecnológico ha desarrollado numerosos aparatos diagnósticos y terapéuticos basados en el efecto de las ondas electromagnéticas.

La radiación electromagnética con fines terapéuticos se ha empleado desde hace años en medicina, para el tratamiento de un amplio y heterogéneo grupo de enfermedades. La ausencia de claridad en cuanto a sus efectos y el aumento progresivo de su empleo en éste ámbito, hacen destacar la importancia de la continuidad en el estudio de los efectos de la interacción de las radiaciones electromagnéticas con los seres vivos, así como extremar las precauciones en cuanto a su uso.

La utilización de cámaras experimentales de radiación ha permitido la reproducción de efectos biológicos en animales con un control absoluto de los parámetros de exposición. El

empleo de diversos modelos experimentales nos ayuda a un mayor conocimiento de los cambios que sufren los tejidos al exponerse a la radiación.

I.2. GENERALIDADES SOBRE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

I.2.1 Naturaleza y propiedades de los campos electromagnéticos

La producción de la radiación electromagnética es un proceso que se lleva a cabo en todos los confines del Universo. A través del espacio, nos llega radiación electromagnética en todas las regiones del espectro, por lo que nuestro organismo se ha visto sometido, ya desde sus orígenes, a una continua interacción con dicha radiación.

En general la radiación electromagnética es definida como la propagación a través del espacio de energía proveniente de una combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación de la onda (Figura 1).

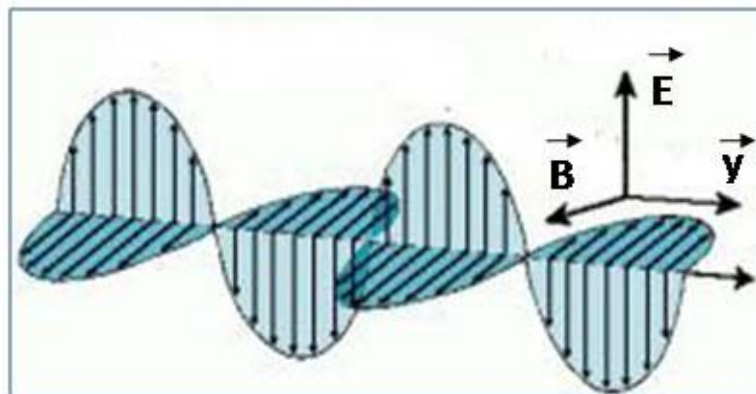


Figura 1. Esquema de una onda electromagnética en forma de onda plana, polarizada en tres planos perpendiculares entre sí: campo eléctrico (E), magnético (B) y dirección de propagación de la onda (y).

Las ondas electromagnéticas se definen por una serie de parámetros entre los que se encuentran la frecuencia (ν), la longitud de onda (λ) y la energía:

- La *frecuencia* de la radiación es el número de ciclos u oscilaciones por unidad de tiempo. Su unidad de medida es el Hercio (Hz), que equivale a un ciclo por segundo.
- La *longitud de onda* es la distancia recorrida por la onda en una oscilación y su unidad de medida es el metro (m).
- La *energía de la radiación* se mide en electronvoltio (eV) y se corresponde con la energía cinética que adquiere un electrón al ser acelerado por una diferencia de potencial de 1 voltio. Según la energía de las radiaciones electromagnéticas podemos clasificarlas en radiaciones ionizantes y no ionizantes, siendo las radiaciones ionizantes las más energéticas porque tienen suficiente energía para arrancar electrones de las capas más externas de los átomos. La energía fotónica de la radiación microonda varía entre $1,24 \cdot 10^{-9}$ eV y $1,24 \cdot 10^{-3}$ eV, resultando insuficiente para alterar estructuras moleculares. En nuestra tesis nos centraremos en la descripción de las radiaciones no ionizantes.

En el espacio, los CEM se describen por dos magnitudes vectoriales: la *intensidad de campo eléctrico* (E) y la *intensidad de campo magnético* (H).

La *intensidad de campo eléctrico* se corresponde con la fuerza ejercida sobre una partícula cargada independientemente de su movimiento en el espacio. Se expresa en voltios por metro (V/m).

La *intensidad de campo magnético* determina un campo magnético en cualquier punto del espacio. Se expresa en amperios por metro (A/m).

Las intensidades de campo cambian sus valores en cada punto del espacio y en cada instante. En el interior del objeto, estas variaciones en las intensidades de campo dependen de:

- las fuentes

- la forma y tamaño del material.
- Y sus características electromagnéticas: Permitividad (ϵ), Permeabilidad (μ) y Conductividad (δ).

1.2.2. Espectro de las ondas electromagnéticas

El espectro electromagnético es el conjunto de ondas electromagnéticas ordenadas en función de su frecuencia o de su longitud de onda. En la **Figura 2** se muestran los rangos aproximados de las radiaciones del espectro electromagnético ordenadas de menor a mayor frecuencia (o de mayor a menor longitud de onda), que se extiende desde las ondas de ELF (extreme low frequency) hasta los rayos gamma .La clasificación carece de límites precisos, ya que fuentes diferentes pueden producir intervalos de frecuencia que se superponen.

Por otro lado, podemos distinguir dos grandes grupos dentro del espectro electromagnético, aquellas radiaciones electromagnéticas que tienen energía suficiente para arrancar electrones de las capas más externas de los átomos, son las *radiaciones ionizantes (RI)*, a este grupo pertenecen los rayos X y gamma. El resto de las radiaciones del espectro electromagnético se encuentra dentro del grupo de *radiaciones no ionizantes (RNI)* por no poseer energía suficiente para la alterar la estructura interna de las moléculas o romper enlaces intermoleculares.

Las distintas frecuencias de cada tipo de onda marcan las características particulares y el diferente comportamiento de cada tipo de radiación. Aquellas radiaciones con una gran longitud de onda y baja energía interactuarán débilmente con la materia como ocurre con las ondas de radiofrecuencia, sin embargo, las radiaciones de gran energía, como las radiaciones infrarrojas y ultravioleta, serán fuertemente absorbidas por la materia.

El desarrollo de las aplicaciones prácticas de las diferentes regiones ha dependido de la capacidad tecnológica de producir fuentes de radiación apropiadas y detectores o medidores sensibles a esas respectivas regiones.

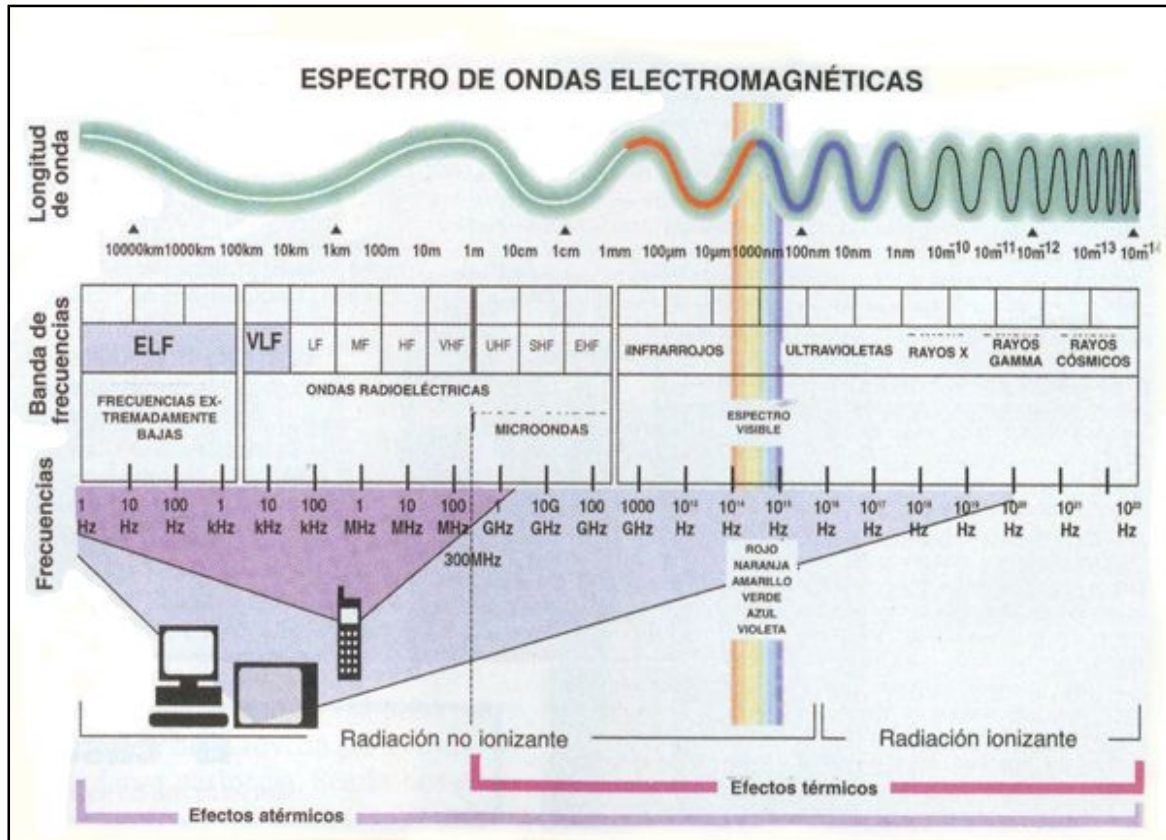


Figura 2.-Representación esquemática del espectro de ondas electromagnéticas con sus respectivas frecuencias y longitudes de onda. (Purves, W.K. , 2004).

Las diversas regiones del espectro electromagnético han sido agrupadas según rangos de frecuencia que determinan características o aplicaciones semejantes, en los siguientes:

- Los campos electromagnéticos de frecuencia inferior a la radiofrecuencia (*Extremly Low Frequency –ELF y Very Low Frequency-VLF*) comprenden la zona del espectro entre 0-100KHz y tienen su origen, en su mayor parte, de la generación, transmisión y utilización de la energía eléctrica en líneas de alta tensión.
- Las ondas de radio se emplean principalmente en los sistemas de comunicación de radio (AM y FM) y televisión (VHF), teléfonos inalámbricos, receptores GPS, y comunicación satelital. Fueron descubiertas en el año 1887 por Heinrich Hertz (1857-

1894). Su empleo con efecto terapéutico se lleva a cabo mediante el uso de corrientes alternas de frecuencia superior a los 100 KHz (onda corta).

- Las microondas tienen multitud de aplicaciones como radar para transporte aéreo y radar doppler para el seguimiento de huracanes y tornados; protocolos inalámbricos (wireless) en comunicaciones e internet; sistemas de radiodifusión y telecomunicaciones como la telefonía móvil, la comunicación por satélite; hornos de microondas para el calentamiento de los alimentos; y en terapéutica médica como diatermoterapia. Las microondas tienen una longitud de onda aproximadamente en el rango de 30 cm (frecuencia = 1GHz) a 1 mm (300 GHz). También se incluye el rango de 1 GHz a 1000 GHz, aunque la mayoría de las aplicaciones van de 1 a 40 GHz. El rango de microondas incluye: *frecuencia ultra alta* (UHF) (0,3 – 3 GHz), *super alta frecuencia* (SHF) (3- 30 GHz) y *extremadamente alta frecuencia* (EHF) (30-300 GHz).
- La radiación infrarroja fue descubierta por el astrónomo William Herschel en el año 1800, al medir la alta temperatura más allá de la zona roja del espectro visible. La zona de IR del espectro no se puede ver, pero sí se puede detectar por la sensación térmica. La banda infrarroja se divide en tres subregiones:
 - Infrarrojo lejano (10^{-3} y 3×10^{-5} m)
 - Infrarrojo intermedio (3×10^{-5} m a 3×10^{-6} m)
 - Infrarrojo cercano (se extiende hasta alrededor de 7.8×10^{-7} m)
- La luz visible es la banda del espectro electromagnético visible para el ojo humano. Isaac Newton fue el primero en descomponer la luz visible blanca del sol en sus componentes empleando un prisma. Las frecuencias más bajas de la luz visible se perciben como rojas y las de más alta frecuencia se visualizan de color violeta.
- Los rayos ultravioleta fueron descubiertos en el año 1801 por Ritter cuando estudiaba las propiedades fotoquímicas de los diversos colores del espectro solar (Zaragoza, J.R.,

1992). Ritter encontró que más allá de la zona inmediata al violeta existía una radiación de gran efecto fotoquímico que llamó radiación ultravioleta. La radiación UV se divide en tres zonas:

- Ultravioleta próximo (380 a 315 nm) o ultravioleta A (UVA).
- Ultravioleta medio (315 a 280 nm) o UVB.
- Ultravioleta corto (280 a 185 nm) o UVC.

El Sol es nuestra principal fuente de luz visible en el planeta Tierra. Además emite radiación UV en las bandas UVA, UVB y UVC, pero debido a la absorción en la capa de ozono de la atmósfera, el 99% de la radiación UV que llega a la superficie terrestre es UVA.

- Los rayos X fueron descubiertos en 1895 por el físico alemán Wilhelm Konrad Röntgen cuando estudiaba el efecto del paso de la corriente eléctrica por tubos de vacío. Los rayos X se producen por transiciones electrónicas de los electrones internos de átomos pesados (radiación de frenado o de Bremsstrahlung). La característica fundamental que la diferencia, junto con los rayos gamma, del resto de las fuentes de radiación EM es su capacidad para ionizar la materia.
- Los rayos gamma son ondas electromagnéticas de origen nuclear. Debido a la alta energía que poseen es un tipo de radiación ionizante, capaz de interactuar con la materia orgánica y producir daño celular. Su fuente de emisión son sustancias radioactivas ya sean de origen natural (rayos cósmicos) o artificial (reactores nucleares). La distinción entre los rayos X y gamma depende de la fuente de radiación y no de la longitud de onda: los rayos X son generados por procesos electrónicos energéticos y los rayos γ por transiciones en los núcleos atómicos.

Desde el punto de vista médico, resulta interesante clasificar a las radiaciones no ionizantes en tres grandes grupos (Martínez Morillo, M. y cols., 1998):

a)- La **Fototerapia** corresponde a la zona de las radiaciones solares con su componente visible e invisible (ultravioleta e infrarrojo), así como formas especiales de emisión, como la radiación laser. Los efectos principales de este grupo de radiaciones son el calor y los efectos fotoquímicos, siendo el efecto térmico predominante de la radiación infrarroja, y el efecto fotoquímico de la radiación ultravioleta.

b)- Las **Microondas y radiofrecuencias** tienen como efecto principal el calentamiento profundo de los tejidos radiados, explicado por la vibración forzada de las moléculas orgánicas y de agua al ser sometidas a microondas de determinada energía.

c)- Las **Radiaciones de extremadamente baja frecuencia o ELF** (extremely low frequency) se aplican en magnetoterapia por su efecto electromagnético y en electroterapia por su efecto térmico y electroquímico.

1.2.3. Cuantificación del campo electromagnético en el tejido irradiado. Cálculo del SAR

La cantidad física básica de energía electromagnética que determina el efecto biológico es el campo electromagnético inducido dentro del organismo expuesto a la radiación incidente. La **dosimetría** se define por tanto como la determinación de la *energía absorbida* por un cuerpo expuesto a los campos eléctrico y magnético que componen una señal de radiofrecuencia (Sebastián Franco, J.L. y cols., 2006).

La absorción de la energía electromagnética en los organismos vivos depende fundamentalmente de:

Primero- Los parámetros del campo incidente, es decir, su frecuencia, su polarización, y la disposición del objeto frente al campo incidente.

Segundo- Las características del cuerpo expuesto, como por ejemplo su geometría interna y externa o las propiedades dieléctricas de los tejidos (conductividad y permitividad). Las propiedades dieléctricas de los tejidos están determinadas en gran medida por su contenido en agua. En general, cuanto mayor es el contenido de agua de los tejidos, mayor es su absorción (Schroeder, M.J. y cols., 2008). Los resultados de los valores calculados de permitividad y conductividad de los diversos tejidos biológicos han sido muy variables, dado que los tejidos biológicos son muy heterogéneos, y estos valores pueden verse alterados de forma importante dependiendo del procedimiento de preparación del tejido, o de los cambios metabólicos postmortem, entre otros (Schmid, G. y cols., 2003)

Tercero- Los efectos de tierra, reflexión o refracción y de otros objetos que puedan interactuar entre la fuente y el objeto. La energía incidente es reflejada a nivel de las diversas interfases tisulares. El coeficiente de reflexión, que viene dado por la relación entre la intensidad incidente y la reflejada, es muy elevado en la interfase aire-piel, lo que indica que gran parte de la energía incidente es reflejada sin llegar a penetrar en el tejido.

Para determinar la interacción de la radiofrecuencia con los tejidos resulta imprescindible describir los siguientes parámetros físicos:

- a. La densidad de corriente inducida en los tejidos (J).
- b. La intensidad de campo eléctrico interno (E).
- c. Y el SAR.

La magnitud básica que se emplea para dosimetría de radiofrecuencia-microonda es la ***Tasa de absorción específica*** (TAE ó SAR acrónimo en inglés Specific Absorption Rate), que ha sido definida como la cantidad de energía electromagnética absorbida por un tejido por unidad de masa. Su unidad de medida es el watio por kilogramo (W/Kg).

El SAR es una medida del campo eléctrico en el punto de estudio y de la razón de calentamiento local (dT/dt).

$$dT/dt = SAR/c \quad (^\circ C/sg)$$

siendo c la capacidad calorífica del tejido ($J/Kg^\circ C$)

La *fórmula matemática* empleada para el cálculo del SAR es la siguiente,

$$SAR = \sigma \cdot E_t^2 \cdot \rho^{-1} \quad (W/Kg)$$

siendo E_t el campo en el tejido t (V/m), σ la conductividad eléctrica del tejido (S/m) y ρ la densidad del tejido (kg/m^3).

Como apreciamos en la fórmula, el SAR en los tejidos es proporcional al cuadrado de la intensidad del campo eléctrico generado en el interior del tejido, debido a esto se hace extremadamente complejo determinar mediciones de SAR. Por esta razón las alternativas encontradas son la estimación del SAR en fantasmas humanos en laboratorios o bien realizar cálculos computacionales mediante herramientas de software específicamente desarrolladas.

A nivel experimental es imprescindible definir dos magnitudes de SAR, cuya determinación va a ser útil en los cálculos de dosimetría:

- a) La **SAR promediada sobre el cuerpo completo** es un valor único de SAR que representa la magnitud de SAR promediado sobre todo el cuerpo expuesto a radiofrecuencia.
- b) La **SAR local** es un valor único de SAR que representa la magnitud de SAR en una pequeña porción del cuerpo expuesto a radiofrecuencia.

1.2.4. Normativa relativa a los campos electromagnéticos

Ante el aumento progresivo de todo tipo de radiaciones electromagnéticas artificiales en el medio ambiente surge la necesidad de investigar los peligros que pueden ser asociados con las diferentes formas de RNI y en base a esto establecer unos criterios de seguridad ante exposiciones a dichas radiaciones. Por ello, varios grupos de trabajo sobre protección radiológica en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) crean en el año 1992 la *Comisión Internacional para la Protección de las Radiaciones no Ionizantes (ICNIRP)*. Esta Comisión, tras realizar una evaluación exhaustiva y rigurosa de toda la evidencia científica disponible hasta el momento, publicó en 1998 unas recomendaciones para limitar la exposición a campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos (ICNIRP, 1998). Estas directrices marcan un umbral por debajo del cual la exposición a CEM se considera segura. Los límites de exposición están basados en los efectos de la exposición aguda a corto plazo, antes que en la exposición a largo plazo, ya que la información científica disponible sobre los efectos a la exposición de los CEM a largo plazo es considerada insuficiente para establecer límites cuantitativos.

Cada país establece sus propias normas nacionales relativas a la exposición a CEM; la mayoría de ellas se basan en las recomendaciones de la ICNIPR. El Consejo de Ministros de Sanidad de la Unión Europea hizo suyos los criterios de la ICNIPR y promulgó unas recomendaciones para la protección del público en general ante las radiaciones no ionizantes de 0Hz a 300GHz (RCMSUE-1999/519/CE de 12 de julio de 1999). Posteriormente España elaboró una normativa que regula a nivel nacional los principios de la Recomendación del Consejo de Ministros de Sanidad de la Unión Europea (Real Decreto 1066/2001, de 28 de Septiembre). Esta normativa establece condiciones de protección del dominio público radioeléctrico, restricciones a las radiaciones radioeléctricas, y medidas de protección sanitaria frente a emisiones radioeléctricas. Algunas CCAA han publicado sus propias legislaciones, en cuatro de ellas se respetan los límites del Real Decreto estatal (Castilla –León, Baleares, La

Rioja, y Madrid) y en las otras tres se reducen a la mitad (Cataluña, Navarra, Castilla-La Mancha).

Tanto en la RCMSUE como en la normativa elaborada por el Comité Español se concluye que no existe evidencia de que exposiciones a campos electromagnéticos dentro de los límites establecidos puedan provocar efectos adversos para la salud humana. Por otro lado, dice que los estudios epidemiológicos pueden no tener un suficiente periodo de latencia y/o exposición para obtener conclusiones definitivas. Por el momento tampoco existen estudios científicos amplios y certeros que nos aseguren la inocuidad de la exposición a dichos campos electromagnéticos. Sin embargo, estas recomendaciones de seguridad se encuentran en continua revisión y abiertas a posibles modificaciones en relación con la continua evaluación de nuevos hallazgos referentes a los efectos de los CEM sobre el cuerpo humano.

1.2.5. Límites de exposición a los campos electromagnéticos

Los niveles de referencia y las restricciones básicas a los CEM emitidas por la ICNIRP (1998) son las más ampliamente aceptadas a nivel mundial.

- Las ***restricciones básicas*** son restricciones a la exposición de los campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos variables en el tiempo, basadas en los efectos sobre la salud y en consideraciones biológicas (Tabla 1).
- Los ***niveles de referencia*** determinan la probabilidad de que se sobrepasen las restricciones básicas siendo su objetivo asegurar el cumplimiento de las mismas (Tabla 2).

Los límites de exposición establecidos por la guía ICNIRP son más estrictos para la exposición del público en general que para las exposiciones ocupacionales. La justificación de la ICNIRP es que la población expuesta ocupacionalmente incluye población adulta y entrenada para tomar las precauciones adecuadas, mientras que la población general abarca todas las

edades y generalmente son inconscientes del grado de exposición y de las medidas cautelares a tomar.

Para los rangos de frecuencia comprendidos entre 100KHz y 10GHz las restricciones básicas son proveídas en términos de SAR para prevenir el estrés térmico de todo el cuerpo y el calentamiento localizado de los tejidos. Todos los valores del SAR deben ser promediados sobre cualquier periodo de 6 minutos. Además, la masa para promediar el SAR localizado se considera cualquier tejido contiguo de 10 gr de masa.

<i>Características de la exposición</i>	<i>SAR promedio en todo el cuerpo (WKg⁻¹)</i>	<i>SAR localizado cabeza y tronco (WKg⁻¹)</i>	<i>SAR localizado extremidades (WKg⁻¹)</i>
Exposición ocupacional	0,4	10	20
Exposición al público en general	0,08	2	4

Tabla 1 Restricciones básicas para exposiciones a campos eléctricos y magnéticos para frecuencias de 10MHz-10GHz (ICNIRP, 1998).

	<i>Intensidad de campo eléctrico, E (V/m)</i>	<i>Intensidad de campo magnético, H (A/m)</i>	<i>Inducción magnética, B (μT)</i>	<i>Densidad de potencia de onda plana equivalente</i>
Exposición ocupacional	137	0,36	0,45	50
Exposición al público en general	61	0,16	0,20	10

Tabla 2. Niveles de referencia para exposiciones a campos eléctricos y magnéticos para frecuencias de 2-300 GHz. (Directiva 2004/40/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 29 de Abril; Recomendación del Consejo de 12 de julio de 1999, 1999/512/CE)

I.3 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACION ELECTROMAGNÉTICA NO IONIZANTE

I.3.1. Clasificación general de los efectos biológicos

Los *efectos biológicos* hacen referencia a las respuestas medibles en aquellas personas expuestas a radiación, que pueden resultar o no en efectos adversos para la salud. Estos efectos han sido clasificados de la siguiente manera (Sebastian Franco, J.L. y cols., 2006; Laurence, J.A. y cols., 2000): efectos térmicos, atérmicos y no térmicos.

- 1) Los *efectos térmicos* ocurren cuando en el organismo se deposita energía suficiente como para aumentar la temperatura de forma medible. La radiación electromagnética se absorbe y se transforma en calor. El mecanismo molecular básico de producción de calor se debe a que la interacción de la radiofrecuencia con el tejido genera vibraciones y oscilaciones de moleculares polares, como el agua, en el interior del organismo. Esta energía rotacional es transformada en calor (Challis, L.J., 2005).
- 2) Los *efectos atérmicos*, se producen cuando la energía depositada es suficiente para producir un incremento de temperatura en el tejido biológico, pero sin que llegue a activar los mecanismos de termorregulación. Los efectos biológicos observados por este tipo de radiación son principalmente inducir corrientes eléctricas que pueden estimular las células nerviosas y musculares.
- 3) Los *efectos no térmicos* ocurren cuando la energía depositada en el objeto biológico no tiende a producir aumento de temperatura (Challis, L.J., 2005).

La mayoría de las normas internacionales de regulación de las RNI consideran que los mecanismos implicados en los efectos biológicos principales involucran un efecto térmico. Una elevación de temperatura puede alterar el funcionamiento de diversos sistemas biológicos e incluso provocar un daño irreversible. Aunque hay suficiente evidencia sobre los efectos térmicos producidos por el calentamiento de los tejidos expuestos a radiación microonda, sin

embargo, en las últimas décadas se ha abierto un importante debate sobre la posibilidad de la existencia de efectos no térmicos que no se explican por el aumento de temperatura tisular (Dawe, A.S., y cols., 2006; Banik, S. y cols., 2003).

Existen múltiples estudios experimentales cuyos hallazgos han sido atribuidos a la posible existencia de efectos biológicos debidos a la exposición a campos electromagnéticos de baja intensidad que no parecen ser debidos al calentamiento de los tejidos. Diversos estudios revelan que las microondas podrían inducir alteraciones fisiológicas de naturaleza atérmica (Banik, S. y cols., 2003), como alterar los procesos metabólicos celulares (Samarketu, S.P. y cols., 1996) y alterar la estructura y la función de la membrana celular (Phelan, A.M. y cols., 1994). Recientes investigaciones en cultivos celulares describen que dosis atérmicas de radiofrecuencia pueden inducir cambios en la expresión genética (Lee, S. y cols. 2005). La evidencia de que la radiofrecuencia a dosis atérmicas estimula la producción de las proteínas del choque térmico podría explicar los efectos de la RF en las alteraciones fisiológicas celulares que tienen lugar tras la exposición a la radiación (French, P.W. y cols., 2000). Sin embargo, otros autores no han podido corroborar estos resultados (Adair, R.K., 2003; Chauhan, V. y cols., 2006), por ello los consideran poco fiables. Además, explican estos efectos por posibles errores en los sistemas de medida de temperaturas, o por la existencia de puntos calientes (“hot spots”) que no han sido detectados (Antonio, C. y Deam, R.T., 2007). Por todo ello, es necesario realizar más investigaciones para obtener resultados concluyentes.

A nivel del SNC se han encontrado indicios, tanto en humanos como en animales, de efectos no térmicos de la microonda, entre los que podemos destacar las alteraciones en la actividad eléctrica cerebral (Sinha, R.K. y cols. 2008), en la actividad colinérgica del cerebro (Lai, y cols., 1989, Vorobyov, V. y cols., 2004), alteraciones en la fosforilación de determinadas proteínas (Leszczynski, D. y cols., 2002), incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Neubauer, C. y cols., 1990) y disminución en la actividad sináptica excitatoria a nivel de neuronas del hipocampo (Xu, y cols., 2006).

Por otro lado, se han observado efectos que ocurren exclusivamente a dosis atómicas de radiación. Los efectos biológicos de exposiciones a bajas frecuencias no tienen una proporción lineal a la potencia de radiación (efecto ventana) o al tiempo de exposición (mecanismo de adaptación) como cabría esperar. Sin embargo, dichos efectos no han sido observados tras exposiciones a dosis térmicas. Por ello, algunos autores postulan que los efectos ventana y de adaptación se encuentran relacionados con mecanismos no térmicos (Laurence, J.A. y cols., 2000; Kwee, S., 2006).

Todo esto hace que la comprensión de los mecanismos biológicos de interacción con los CEM, en especial de los mecanismos que subyacen a los efectos no térmicos “propios de la radiofrecuencia”, sea un tema de actualidad en investigación y debe ser aclarado dado el potencial riesgo de efectos adversos para la salud.

1.3.2 Empleo de sistemas de radiación

Para llevar a cabo estudios experimentales en animales sobre los efectos de la radiofrecuencia, se han diseñado sistemas de exposición a la radiación. El diseño de estos sistemas es complicado ya que intervienen multitud de parámetros a veces difíciles de controlar (Swicord, M. y cols., 1999).

Se ha diseñado un sistema experimental de exposición a radiofrecuencia que permite la medida de la potencia absorbida del animal en las regiones de interés, de forma controlada (López-Martín, E. y cols., 2008).

1.3.3 Investigación de los efectos de los CEM en los seres vivos (animales y humanos).

Efectos sobre el sistema nervioso central y sobre el sistema endocrino

La existencia de efectos biológicos de los CEM se encuentra ampliamente demostrada. Sin embargo, como acabamos de comentar, todavía existe una importante laguna en cuanto al

conocimiento de los mecanismos de interacción y al papel de efectos indirectos de la microonda y de posibles efectos no térmicos.

Recientemente se ha resaltado la especial importancia del estudio de la interacción de los CEM con el sistema nervioso central (SNC), dado que el tejido neural es especialmente sensible a la radiación electromagnética y se encuentra cercana a la fuente de exposición en el caso de la telefonía móvil. A este respecto, los estudios experimentales se han centrado fundamentalmente en determinar la respuesta a nivel celular y molecular de la aplicación de microonda, tanto a potencias térmicas como no térmicas. Sin embargo existen ambigüedades que dificultan la obtención de conclusiones firmes, como consecuencia de la amplia variedad metodológica empleada sobretodo en cuanto al tipo de exposición (frecuencia, potencia, modulación, etc) y a errores en las mediciones termométricas y en la determinación del SAR.

Existe evidencia de alteraciones fisiopatológicas en la función cerebral, cuya base científica yace fundamentalmente sobre los hallazgos de alteraciones en la frecuencia del EEG, el estado de sueño-vigilia y los trastornos del comportamiento.

1.3.3.1. Alteraciones en el electroencefalograma

Uno de los efectos de la exposición del SNC a RF que más se ha estudiado es la posibilidad de producir cambios en el electroencefalograma (EEG). Los estudios realizados tanto en animales como en seres humanos obtienen resultados contradictorios, sin llegar ninguno a ser concluyente. Esta variabilidad en los resultados puede encontrarse relacionada con hallazgos recientes que indican que puede existir una relación dosis-respuesta entre la exposición a la radiación electromagnética y la aparición de efectos fisiológicos detectados electroencefalograficamente (Regel, S.J. y cols., 2007), una sensibilidad individual a los efectos de la microonda que constituya un factor determinante para el desarrollo de alteraciones en la actividad cortical (Hinrikus, H. y cols. 2008a), así como porque el efecto de la microonda varía

según la frecuencia de modulación. Se ha encontrado que a frecuencias de modulación mayores se intensifican las ondas alfa y beta (Hinrikus, H. y cols., 2008b).

En la gran mayoría de los estudios en los que se evidencian cambios electroencefalográficos coinciden en observar un aumento en la actividad eléctrica de las bandas alfa y beta (D'Andrea, J.A. y cols. 2003, Hinrikus, H. y cols., 2008b). Dado que los cambios en la frecuencia del EEG dependen de diversos factores como la frecuencia de exposición, el tiempo de exposición y la modulación, en general los estudios difícilmente pueden ser comparables entre sí dadas las diferencias en la dosis, el tiempo de exposición, la escasa precisión dosimétrica y la falta de localización estereotáxica de la relación de la antena con las áreas cerebrales (Hamblin, D.L. y col., 2002).

Se ha demostrado experimentalmente en animales que la exposición aguda de microonda a frecuencias de 42,2 y 50.3 GHz provoca alteraciones en el patrón de base de la actividad de neuronas del núcleo supraóptico del hipotálamo. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con la estimulación de neuronas gabaérgicas y glutamérgicas del hipotálamo y secundariamente con los mecanismos que intervienen en los efectos biológicos de la microonda en la actividad cerebral (Minasyan, S.M. y cols., 2007).

Dosis crónicas de microonda a 2,450 MHz en experimentación animal reflejan alteraciones significativas en el EEG en cuanto a la disminución en la actividad de las bandas α , δ y θ , y el aumento de β_1 y β_2 . (Sinha y cols., 2008).

Recientemente se han encontrado diversas alteraciones provocadas por radiaciones electromagnéticas asociadas o no a patologías cerebrales en un modelo experimental con drogas a dosis subconvulsivas (López Martín, E. y cols., 2006), que podría indicar la existencia de un efecto sinérgico potenciador de la microonda con determinados fármacos, y así mismo podría indicar la posibilidad de que la microonda desencadene procesos fisiopatológicos en neuronas predispuestas (sensibilidad individual).

1.3.3.2. Efectos sobre el comportamiento

La mayoría de los estudios sobre alteraciones del comportamiento tras exposiciones a radiación microonda han demostrado que éstos dependen de factores de la propia radiación que determinan el SAR, como la frecuencia y la polaridad. Hasta el momento, el umbral de SAR establecido a partir del cual se detectan alteraciones en el comportamiento se encuentra cerca de 4W/Kg (D'Andrea J.A., 1999).

Se han publicado pocos estudios que examinen aspectos cognitivos durante o tras la exposición a microonda. Ha sido demostrada, en animales de laboratorio, la existencia de alteraciones cognitivas que se han relacionado con cambios en la función de los sistemas colinérgicos (Lai, H. y cols., 1991; Testylier, G. y cols. 2002), alteraciones en los receptores de neurotransmisores cerebrales, alteraciones en la capacidad de memoria espacial (Nittby, H. y cols., 2008) y alteraciones en los efectos de diversas drogas psicoestimulantes.

Los estudios clínicos realizados en grupos ocupacionales describen varios procesos relacionados con la exposición prolongada a la microonda: el síndrome neurasténico, el síndrome de distonía autonómica (alteración del SN parasimpático) y el síndrome diencefálico (alucinaciones, insomnio, síncope y alteraciones funcionales viscerales) (Silvermann, C., 1973).

Parece existir una fuerte correlación entre las alteraciones de la función tiroidea y el desarrollo de trastornos de la memoria, el aprendizaje y la emotividad. Se postula que la radiación microonda puede afectar bien directa o indirectamente a la función tiroidea, y de hecho, se han demostrado alteraciones en los niveles de hormonas tiroideas tras exposiciones crónicas a microonda de 2.450 MHz (Sinha, R.K., y cols., 2008), siendo estas alteraciones equiparables al de un síndrome eutiroides.

Recientemente, se han encontrado posibles alteraciones en la actividad sináptica excitatoria (receptores del glutamato) de neuronas hipocampales de ratas tras la exposición a

radiación electromagnética a baja intensidad y de forma crónica (Xu, S. y cols., 2006), así como cambios en la actividad neuronal en el núcleo supraóptico del hipotálamo de ratas radiadas con microonda a baja intensidad (Minasyan, S.M. y cols., 2007). Estos hallazgos se han relacionado con los mecanismos que explicarían las alteraciones cognitivas tras la exposición a microondas.

1.3.3.3. Efectos sobre la barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE constituye un complejo anatómico y fisiológico cuya función principal es regular el paso de sustancias al sistema nervioso central y de esta manera mantener una adecuada homeostasis fundamental para la viabilidad celular (Khan, E., 2005). Esta constituida por la barrera aracnoidea, la barrera de líquido cefaloraquídeo y una red de estrechas uniones entre células endoteliales adyacentes de los capilares cerebrales (Nolte J., 1994). Funcionalmente se comporta como un filtro que permite el paso de determinadas sustancias desde la sangre al cerebro. Esta selectiva permeabilidad de la BHE puede verse alterada por infinidad de condiciones patológicas.

Los efectos de la energía de la microonda sobre la función de la BHE se encuentran todavía en controversia. La mayoría de los estudios describen un aumento de la permeabilidad de la BHE en ratas expuestas a radiación microonda que relacionan con alteraciones funcionales de las células endoteliales producidos por el aumento de temperatura (Williams, W.M. y cols., 1984). Se ha postulado que el desarrollo de tumores en el SNC puede ser el resultado de la entrada de sustancias carcinogénicas al cerebro debido al aumento de la permeabilidad de la BHE, así como también, la alteración del medio extracelular podría explicar la mayor susceptibilidad a sufrir ataques epilépticos (Fritze, K., y cols., 1997b).

Los estudios sobre efectos atérmicos propios de la radiación de microonda que sugieren que bajas potencias de radiación microonda ($\leq 10\text{mW/cm}^2$) pueden alterar la permeabilidad de la BHE no han podido ser corroborados hasta el momento (Oskar, K.J. y cols., 1977;

Leszczynski, D., y cols., 2002; Franke, H. 2005; Cosquer, B. y cols., 2005). Se han publicado alteraciones de la fosforilación de determinadas proteínas que intervienen en la permeabilidad de la BHE tras dosis atérmicas de radiación (Leszczynski, D. y cols., 2002).

Paradójicamente los estudios que relacionan la exposición a dosis atérmicas de microonda con efectos a nivel de la BHE han observado que la exposición a muy bajos niveles de SAR produce una mayor extravasación de albúmina que niveles altos de SAR, lo que se ha dado por llamar “efecto ventana” (Grafström, G. y cols., 2008).

Actualmente se está investigando la posibilidad de potenciar el efecto terapéutico de determinados fármacos mediante el aumento de la permeabilidad de la BHE tras la exposición a radiación electromagnética, lo que facilitaría el paso de fármacos al sistema nervioso central y de esta manera aumentaría su eficacia (Lin J.C. y cols., 1998; Kuo Y.C. y cols., 2007). También han sido estudiados los efectos a largo plazo de la exposición repetida a radiofrecuencia, en animales de laboratorio. Tampoco se ha podido demostrar la existencia de alteraciones en la permeabilidad de la BHE ni datos que sugieran daño neuronal (Kuribayashi M, y cols, 2005; Masuda, H. y cols., 2007; Grafström, G. y cols., 2008).

1.3.3.4. Efectos morfológicos a nivel del sistema nervioso central

Existen pocas publicaciones científicas que determinen los efectos morfológicos de la exposición a microonda a frecuencias de 2,45 GHz. Los hallazgos han demostrado que la respuesta a dicho estímulo es una respuesta no uniforme a nivel cerebral. En concreto, se ha encontrado una mayor estimulación de las áreas ventrales del cerebro medio y posterior (Walter, T.J. y cols., 1998). Existen diversas posibilidades que expliquen esta respuesta como el calentamiento no uniforme del tejido cerebral, la implicación de la activación de áreas que intervienen en la termorregulación, o la respuesta de estrés celular causada por la propia radiación.

Ha sido descrita la existencia de una reacción glial transitoria a los dos días de la exposición aguda a microonda de 900 MHz a nivel de varias áreas encefálicas (Brillaud, E. y cols., 2007), así como tras la exposición crónica a 2,45 GHz (Paulraj, R. y col., 2006). La activación de la astrogliosis ha sido mayor a nivel de áreas localizadas cerca de los ventrículos y del espacio subaracnoideo, lo que indica que la BHE puede tener un importante papel en estos cambios. Además, la respuesta a nivel de las diversas áreas encefálicas se desarrolla de forma variable tanto temporal como espacialmente.

También, se han descrito otras alteraciones histopatológicas en el cerebro de ratas expuestas a dosis agudas de radiación microonda, como la detección de *dark neurons* y agregados de lipofusina en las neuronas, que se han relacionado con efectos de naturaleza térmica (Zhao, Y.L. y cols., 2004; Grafström, G. y cols., 2008). Sin embargo, otros estudios, no han detectado alteraciones ni morfológicas ni proteicas a nivel de astrocitos ni microglía que indiquen la existencia de posible daño cerebral (Thorlin, T. y cols., 2006).

A dosis crónicas de 900 MHz la microonda es capaz de disminuir la actividad neuronal en el cerebro de ratas expuestas, detectada por una disminución de la actividad de la enzima citocromo oxidasa en la corteza frontal, el córtex posterior, el hipocampo y el septum (Ammari, M. y cols., 2008). También, la exposición crónica a microonda de 2,45 GHz produce una disminución significativa de la proteincinasa C en el hipocampo (Paulraj, R. y col., 2006). A nivel neuronal se ha descrito posibles alteraciones a dosis atérmicas, que afectan sobre todo a la corteza, el hipocampo y los ganglios basales (Salford, L.G., y cols., 2003).

I.4. APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LA RADIACIÓN MICROONDA EN MEDICINA FÍSICA Y REHABILITACIÓN

Las microondas o también conocidas como ondas decimétricas u ondas radar son corrientes electromagnéticas de alta frecuencia que ocupan el espacio en el espectro electromagnético que va desde las ondas VHF hasta el infrarrojo (300 MHz-300GHz). El Congreso Americano de Medicina Física celebrado en Atlantic City (1948) normalizó los generadores radar con fines médicos, empleándose las siguientes frecuencias y longitudes de onda para aplicaciones médicas: 915 MHz (32,7 cm), 433,92 MHz (69 cm) y 2450 MHz (12,25cm) (Robertson, V.J. y cols., 2006). Desde los años 60 existe también aparatos que operan a 433.92 MHz (69 cm) llamados de UHF u ondas decimétricas.

En España, la gran mayoría de los aparatos de diatermia por microonda para terapéutica física operan a una frecuencia de 2450MHz, correspondientes a una longitud de onda de 12,25cm (Guy, A.W. y cols., 1974).

I.4.2. Diatermia electromagnética

La diatermia electromagnética es un tipo de técnica terapéutica que consiste en la producción de calor en los tejidos por la resistencia que éstos ofrecen al paso de una corriente de alta frecuencia. Esta energía es absorbida por los tejidos y transformada en calor, lo que da lugar a un aumento de temperatura de los tejidos tratados (*Efecto Joule*). En fisioterapia, se aplican dos tipos de modalidades terapéuticas de diatermia electromagnética, la onda corta y la microonda, ondas centimétricas u ondas radar. En 1948, en la *Conferencia de Atlantic City*, se definieron las longitudes de onda para los generadores de uso médico, siendo los 27,12 MHz, de frecuencia, correspondiente a 11,06 metros de longitud de onda, la más utilizada para la onda corta; y 2450 MHz de frecuencia (12,25 cm de longitud de onda) y 915 MHz, para la microonda.

1.4.3. Mecanismo de producción. Aparatos de Microondas

El mecanismo de producción de la radiación microonda es conocido como **magnetrón** o **klistrón**. Consiste en un cilindro metálico aniónico que presenta una serie de cavidades que se comunican con un espacio central más amplio, en cuyo centro hay un filamento metálico (cátodo) conectado a una corriente continua, y sometido a un campo magnético (Figura 3). Al activar la corriente eléctrica el filamento central emite electrones que son atraídos por las cavidades (ánodo). Los electrones que penetran en las cavidades realizan un movimiento circular generando un campo electromagnético. La frecuencia de la corriente producida dependerá del tamaño de dichas cavidades. La radiación se recoge por medio de un cable coaxial hasta un director o radiador desde el cual se realiza la aplicación terapéutica. La presencia y distribución del campo de radiación es verificado mediante detectores fluorescentes.

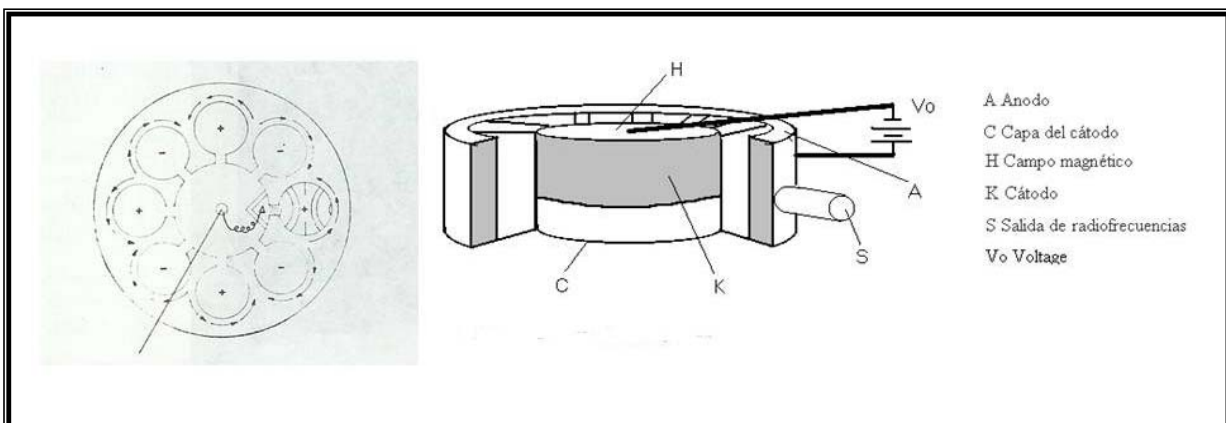


Figura 3.- Diagrama representativo de un magnetrón.

En Europa, la mayoría de los aparatos de diatermia por microondas para fisioterapia operan a una frecuencia de 2,45GHz. Básicamente, todos los equipos de diatermia por microondas disponen de un *cuerpo central*, donde se localiza el magnetrón o klistrón, conectado por un *cable coaxial* que transmite la energía a la antena, y un brazo articulado en cuyo extremo se sostienen los *directores* o *aplicadores* en los que se localiza la antena (Figura 4). Existen

diferentes tipos de aplicadores en función de su forma y según si realiza contacto con la superficie corporal o no (aplicador estándar). Clásicamente existen tres tipos de directores:

- a) Los circulares, en donde el calentamiento es menor en el área central por lo que se suelen emplear en zonas corporales delimitadas y sobre prominencias óseas o articulaciones muy superficiales.
- b) Los rectangulares o alargados, que concentran el calor en la zona central y se emplean en grandes áreas corporales de la espalda y las extremidades.
- c) Los aplicadores de artesa, con forma de cubeta, se adaptan por su forma a diversas áreas anatómicas como la rodilla o la cintura escapular.

Los aplicadores de contacto directo, a diferencia de los estándares, proporcionan un mejor acoplamiento y una radiación dispersa menor, pero tienen el problema del calentamiento selectivo de la superficie y bordes del aplicador. Este problema se ha intentado reducir mediante la incorporación de un sistema de enfriamiento por aire o líquido (Goats, G.C., 1990).



Figura 4.- Unidad de diatermia por microonda.

La forma de emisión puede ser continua o pulsada. Actualmente, la mayoría de los aparatos proporcionan ambas modalidades. La forma pulsada tiene un efecto diatérmico más suave, ya que permite una mayor disipación del calor en las pausas de emisión por la aplicación intermitente.

1.4.3. Bases físicas de la terapéutica por microondas

Las microondas al encontrarse cercanas en el espectro a las ondas lumínicas comparten muchas de sus propiedades, en especial la ***propagación*** en línea recta y sus propiedades de ***reflexión, refracción, difracción y absorción*** (Zaragoza, J.R., 1992).

La ***propagación*** del haz de microondas se produce en línea recta y la intensidad del haz de radiación va disminuyendo según se aleja del foco emisor, por dos razones fundamentalmente:

- En primer lugar por la divergencia del haz. Las microondas salen del aplicador en forma de haz cónico, de manera que se ensancha según se aleja. Esta dispersión está en relación inversa al radio del reflector y directa con la longitud de onda.
- En segundo lugar por la absorción de la energía electromagnética al atravesar el material.

La ***absorción*** de las microondas en el tejido biológico va a depender fundamentalmente de tres factores:

- La longitud de onda. Cuanta menor longitud de onda, mayor absorción.
- Las propiedades electromagnéticas del tejido biológico: la permitividad y la conductividad.
 - La conductividad del absorbente refleja la facilidad con que los iones se desplazan por el medio impulsados por el campo eléctrico. Cuanta mayor conductividad eléctrica del tejido, mayor absorción, es decir, la absorción

de la microonda es muy superior en los tejidos con alto contenido en agua (vasos sanguíneos, músculo, piel húmeda, ojos y órganos internos), respecto a los tejidos grasos y el hueso. Los valores para la conductividad del tejido determinados experimentalmente no son reproducibles debido probablemente a las diferentes formas y técnicas empleadas en su cálculo (Ward, T.R., y cols., 1986; Sebastian Franco, J.L. 2006).

- Y por último, el espesor de grasa subcutánea, a mayor grosor del tejido graso, mayor penetración de la microonda.

La característica principal del tratamiento por este tipo de ondas electromagnéticas es que produce un calentamiento profundo, ya que por las características que acabamos de describir, la microonda atravesará la piel y el tejido graso de escasa absorción y cederá su energía a las capas musculares subyacentes de gran poder de absorción.

Debemos tener en cuenta que existe una pérdida de energía por la reflexión del rayo a su paso por los diversos medios e interfases. El *coeficiente de reflexión* refleja la relación entre la intensidad incidente y la reflejada para cada tejido. La tabla de *Boin y Lotman* (Tabla 3) deja implícito el *coeficiente de reflexión* de las microondas de 2.450 MHz para diferentes interfases. Estos valores muestran que se puede reflejar una cantidad importante de energía en la superficie de la piel, así como en otras interfases. Esta energía reflejada puede provocar áreas de calentamiento excesivo en tejidos adyacentes con consecuentes quemaduras. Para frecuencias más bajas, como de 915 MHz, el coeficiente de reflexión se verá reducido, con lo que mejorará la cantidad de energía que llega al tejido y la profundidad de penetración (Lehmann, J.F. y de Lateur, B.J., 1993).

Por tanto la profundidad de penetración del haz de microonda varía dependiendo fundamentalmente de las características del tejido y de la frecuencia de la radiación. Las microondas de 2,45GHz penetran aproximadamente 1.7 cm en músculo y piel, y 11,2 cm en

grasa y hueso; mientras que a 915 MHz, estos valores se incrementan a 3,04 cm y 17,7 cms respectivamente (Goats, G.C., 1990).

	<i>AIRE</i>	<i>PIEL</i>	<i>MUSCULO</i>	<i>GRASA</i>
PIEL	0,56			
MUSCULO	0,59	0,001		
GRASA	0,23	0,18	0,21	
HUESO	0,27	0,14	0,17	0,04

Tabla 3.- BOIN y LOTMAN: *coeficiente de reflexión de las microondas de 2450 MHz en diferentes tejidos Podemos observar como el coeficiente de reflexión es muy elevado en la interfase aire-piel, permitiendo una penetración del 44% de la energía.*

I.4.5. Dosificación de la microonda

La determinación del SAR se considera importante cuando se trata de estudiar los efectos biológicos de la radiación por microondas, pero se considera menos importante a la hora de su empleo en la práctica médica, por su dificultad de cálculo. Por ello, en la aplicación médica diaria, la dosis terapéutica a emplear va a depender fundamentalmente de los siguientes factores:

- *la potencia* del aparato de diatermia (wattios), que nos indica la cantidad de energía radiada. Generalmente la potencia varía entre 25 y 200w.
- *El tiempo de aplicación.* Se ha calculado que la exposición efectiva mínima es de 5 minutos alcanzándose reacciones máximas a los 30 minutos de exposición (Lechmann, J.F. 1953).
- *La distancia a la que se coloca el paciente.*
- *La superficie cutánea irradiada.*
- *La sensación térmica del paciente.*

La dosificación subjetiva, basada en la sensación térmica del paciente constituye un indicador muy importante de la dosis, para evitar quemaduras, ya que el aparato de diatermia no

dispone de indicador de temperatura real del tejido radiado. Schliephake (1960) ha establecido una dosificación clínica de acuerdo con la sensación térmica que experimenta el enfermo (**Tabla 4**). En la práctica clínica, por regla general, se recomienda que las enfermedades agudas sean tratadas con una dosis débil (dosis I y II), de corta duración (2-5 m) y para las enfermedades crónicas por el contrario emplearemos mayor dosificación (dosis III y IV).

<i>Grado</i>	<i>Sensación térmica</i>
I	Inferior al umbral de sensación térmica
II	Inicio de sensación de calor
III	Sensación de calor moderada y agradable
IV	Sensación de calor intensa en el límite de la tolerancia

Tabla 4.- *Dosificación Clínica de Schliephake.*

La intensidad de los efectos fisiológicos derivados del calor va a depender del nivel de temperatura tisular alcanzado, la duración de la elevación de la temperatura de los tejidos, la velocidad del aumento de temperatura tisular y, por último, el tamaño del área tratada. El espectro terapéutico aproximado se extiende entre los 40 y los 45.5°C. A partir de esta temperatura hay riesgo de necrosis del tejido. Por tanto, la hipertermia se considera segura si se mantiene bajo 45°C (Dewhirst, M.W., y cols., 2003).

1.4.6. Efectos fisiológicos derivados de la aplicación de diatermia por microondas

Los efectos fisiológicos de la aplicación terapéutica de calor por microonda que determinan sus aplicaciones terapéuticas en Medicina Física y Rehabilitación derivan del incremento de la temperatura del tejido expuesto.

El principal efecto fisiológico es el *aumento del flujo sanguíneo regional* ya que produce la mayoría de los efectos beneficiosos de la hipertermia (Wyper, D.J. y McNiven, D.R., 1976). La vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular dan lugar a una cascada de efectos fisiológicos locales:

- Aumento de la llegada de nutrientes y oxígeno a los tejidos expuestos, favoreciendo la reparación tisular.
- Aumento de la extravasación celular al área expuesta.
- Favorece la producción y secreción de citocinas inductoras de la reparación tisular.
- Mejora el drenaje de sustancias residuales y del exceso de fluidos lo que facilita por ejemplo la reabsorción de hematomas (Lehmann, J.F. y cols., 1993).
- Mejora la capacidad contráctil del músculo mediante el aumento de la actividad ATP asa y la alteración de las propiedades viscoelásticas del tejido conjuntivo.
- Modifica la respuesta nerviosa sensitiva y disminuye la sensación de dolor.

La justificación del efecto analgésico aunque todavía no ha sido aclarado, actualmente es explicado por dos teorías: una hipótesis metabólica y otra neurológica. La *hipótesis metabólica* afirma que la analgesia es secundaria a la disminución de mediadores inflamatorios en el tejido lesionado, lo que interrumpe la irritación de las terminaciones sensitivas libres causantes del dolor; por otro lado, la *hipótesis neurológica* explica que el calor reduce la velocidad de conducción nerviosa y de esta manera decrece el número de impulsos aferentes sensitivos que llegan a la médula espinal.

También se ha demostrado que la hipertermia produce un *aumento de la permeabilidad de la membrana celular*, y que *incrementa la síntesis de proteínas del shock térmico*. Se está estudiando la aplicación de fármacos que actúan específicamente a través de la membrana celular de forma sinérgica con calor, con el objetivo de potenciar su acción. También se está

investigando la posibilidad de obtener efectos terapéuticos beneficiosos mediante la inducción de HSPs previo para favorecer la protección frente a enfermedades musculoesqueléticas (Ogura Y. y cols., 2007; Xiao, J. y cols., 2007, Millar, N.I., y cols., 2008).

En la Tabla 5 se resumen las respuestas fisiológicas que constituyen la base para las aplicaciones terapéuticas del calor.

Efectos Fisiológicos	Referencias bibliográficas
Efecto Analgésico	Wondergem, J y cols., 1988.
Acción antiespasmódica y relajante muscular	<i>Wright and Sluka, 2001</i>
Efecto sedativo general	<i>Lehmann and de Lateur, 1982</i>
Aumento de las propiedades viscoelásticas de músculos, tendones, ligamentos y fibras capsulares.	<i>Lehmann, J.F., y cols., 1970; Robertson, V.J. y cols., 2005.</i>
Acción trófica y antiinflamatoria	<i>Goats, G.C., 1990</i>

Tabla 5.- Efectos fisiológicos de la aplicación terapéutica de calor.

1.4.7. Indicaciones de la aplicación de la terapéutica de microondas en Medicina Física y Rehabilitación

La microonda está indicada en todos aquellos procesos en los que nos interesa obtener una respuesta fisiológica secundaria al aumento de temperatura local de tejidos ricos en agua, como los músculos o tendones, sobre todo cuando éstos se encuentran localizados en zonas con poco espesor de grasa subcutánea (Fadilah, R., y cols., 1987; Lehmann, J.F. y cols., 1983). Las articulaciones localizadas superficialmente también son susceptibles de obtener un

calentamiento eficaz. La zona óptima de tratamiento de las microondas es aquella que se encuentra situada a 3-4 cm de la piel (Rioja Toro, J., 1996).

Por tanto, podemos decir que las indicaciones para la aplicación de la microonda son aquellos procesos que se benefician del efecto terapéutico del calor profundo, preferentemente de tejido muscular y de aquellos con alta concentración de iones y agua. (Robertson, V.J. y cols., 2006). Debido a la escasez de estudios científicos rigurosos que verifiquen la efectividad del tratamiento por microonda, es difícil concretar las indicaciones específicas de la aplicación terapéutica de la diatermia. En general los estudios son comparativos entre la microonda y otros tratamientos de terapia física, y en muchas ocasiones el estudio no se realiza exclusivamente con microonda sino que se comparan grupos tratados con diversas modalidades terapéuticas, lo que dificulta el conocer la eficacia real del tratamiento por microonda aplicada de forma aislada.

Podemos citar de forma general, como indicaciones principales del tratamiento con diatermia por microonda en Medicina Física y Rehabilitación los siguientes:

- Aquellos procesos en los que exista una limitación del recorrido articular secundaria a rigideces del tejido conectivo periarticular, gracias al aumento de las propiedades viscoelásticas del tejido conjuntivo.
- La resolución de hematomas musculares (Lehmann, J.F., 1993).
- Contracturas musculares por su acción antiespasmódica.
- Tendinopatías (Giombini, A., y cols., 2007).
- Procesos artríticos, cuando afecta a articulaciones superficiales.
- Procesos álgicos, preferentemente de origen muscular (miofibrositis, contracturas y espasmos musculares).

1.4.8. Contraindicaciones de la aplicación terapéutica de la microonda en Medicina Física y Rehabilitación

La aplicación de la terapia por microonda puede conllevar un riesgo de quemaduras en pacientes que presenten objetos metálicos en el campo de radiación, como material de osteosíntesis, ya que tales materiales pueden absorber y reflejar la energía electromagnética, calentando excesivamente el tejido adyacente. Tampoco debe ser aplicado en pacientes con disminución o pérdida de la sensibilidad como ocurre en la siringomielia.

En pacientes con dispositivos implantables activos como los marcapasos o desfibriladores, se encuentra contraindicada cualquier tipo de electroterapia, por el riesgo de interferencia con el aparato de marcapasos.

Debemos tener precaución en pacientes con trastornos de la coagulación o traumatismos recientes, ya que la vasodilatación local intensa puede predisponer a una hemorragia local. Especialmente, en los traumatismos en las primeras 48-72 horas no es recomendable aplicar calor local ya que puede facilitar la evolución a una miositis osificante (Booth, D.W. y col., 1989).

La microonda agrava la isquemia en pacientes con arteriopatía obstructiva pudiendo favorecer o provocar la aparición de gangrena. Debe ser empleada con precaución cuando existe un trastorno vascular, estando contraindicada en los trastornos circulatorios graves.

En casos de neoplasias la microonda está contraindicada, ya que el calor puede favorecer la diseminación de las células tumorales, por la vasodilatación local.

Ha de evitarse su aplicación sobre los ojos por el riesgo de dañar el cristalino y producir cataratas.

Aunque no se ha demostrado la posibilidad de lesiones en el feto ni de abortos, por precaución no se recomienda el empleo de la microonda en mujeres embarazadas.

Por último, no se recomienda su utilización a nivel de la placa fisaria en niños antes de concluir la madurez esquelética.

I.5. REGULACION DE TEMPERATURA EN LOS SERES VIVOS

I.5.1. Temperatura corporal normal

Los seres vivos tales como los mamíferos y los pájaros, son homeotermos es decir, son capaces de mantener su temperatura corporal central constante, dentro de unos límites muy estrechos, a pesar de las amplias oscilaciones de la temperatura ambiental (Jessen, C., 2001).

La termorregulación hace referencia a una respuesta adaptativa de los organismos a cambios en la temperatura ambiental (Devaney, E., 2006). Para mantener la temperatura corporal constante, debe existir un equilibrio entre la pérdida y la ganancia de temperatura. La ganancia de temperatura depende fundamentalmente del metabolismo, sobre todo durante la contracción muscular, pero también depende de la absorción de radiación a través del medio y de la transmisión de calor por objetos calientes. Por otro lado, la pérdida de calor depende de la transmisión de radiación al medio, de la evaporación de sudor a través de la piel, de la conducción de calor por contacto directo con superficies más frías, y en menor medida de otros factores como la excreción de orina y otros fluidos.

I.5.2. Mecanismos de termorregulación

El sistema regulador de la temperatura es un complejo circuito neural de conexiones aferentes y eferentes integradas entre sí, y cuyo sistema de control tiene lugar por retroalimentación negativa (*biofeedback negativo*). Posee tres elementos esenciales (Bicego, K.C. y cols., 2007) (Figura 5):

1) ***Sistema de sensores*** o receptores que perciben las temperaturas existentes en el medio ambiente externo y la temperatura corporal central. En los mamíferos los sensores de la temperatura exterior se encuentran localizados en la piel (receptores cutáneos) y los sensores que detectan la temperatura corporal central se encuentran situados en el área preóptica (POA), hipotálamo anterior, troncoencéfalo, médula espinal, y posiblemente en otras localizaciones.

2) **Sistema efector**, constituido por múltiples mecanismos efectores que determinan la respuesta motora, endocrina, metabólica y los efectos conductuales.

3) **Sistema de integración**: constituido por estructuras integradoras que determinan si la temperatura existente es demasiado alta o demasiado baja y que activan la respuesta corporal apropiada. Hasta el momento, no han sido descritos dichos circuitos con claridad, constituyendo en la actualidad un interesante tema de investigación.

El área hipotalámica constituye el principal centro de integración, actuando a modo de termostato sobre el equilibrio que debe de existir entre la pérdida de calor y la producción de calor en el organismo. En el hipotálamo existen termorreceptores que informan constantemente de la temperatura sanguínea, si se produce un aumento de la temperatura se activan los procesos que favorecen la pérdida de calor: vasodilatación cutánea, sudoración y taquipnea. Si disminuye la temperatura sanguínea, el hipotálamo activa los fenómenos que producen calor o intentan conservar la temperatura: estimula la oxidación de la glucosa, produce vasoconstricción cutánea, erección del pelo, y contracciones musculares (escalofríos).

En el hipotálamo anterior se sitúa el centro disipador del calor, y en hipotálamo posterior el centro productor y conservador del calor. En la *región preóptica del hipotálamo anterior (POA)* se localizan neuronas que actúan como termorreceptores centrales, y que además presentan conexiones aferentes provenientes de receptores sensitivos cutáneos y de la médula espinal y eferentes relacionadas con funciones efectoras reguladoras de la respuesta al calor (Boullant, J.A. y Demieville, H. N., 1977; Boullant, J.A., 2000; McAllen, R.M., 2004, Benarroch, E.E., 2007). El *núcleo hipotalámico dorsomedial* se ha relacionado con la regulación térmica a bajas temperaturas (Morrison, S.F. y cols., 2008). El *núcleo hipotalámico paraventricular* constituye un importante núcleo central de integración de la función autonómica y muchos estudios lo relacionan con la respuesta al aumento de temperatura (Yoshida, K., y cols., 2005; Cham, J.L. y Badoer, E., 2007).

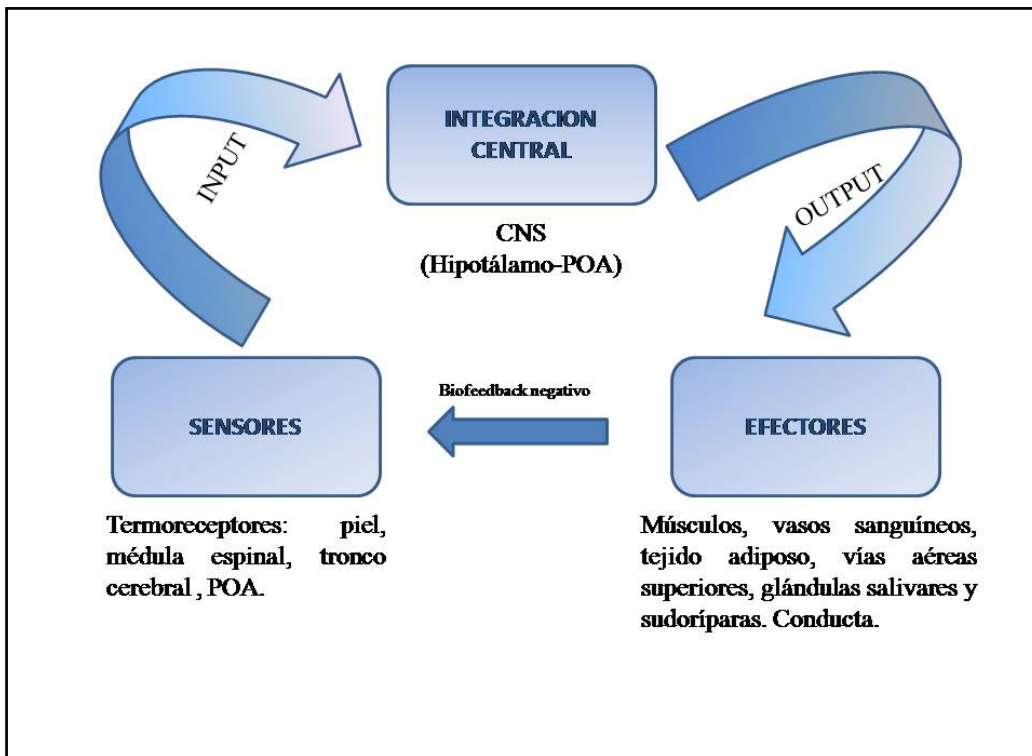


Figura 5.- Esquema del sistema de regulación térmica.

I.6. ESTUDIO DE PARAMETROS DE MEDIDAS DE EFECTOS BIOLÓGICOS DE RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS.

I.6.1. Determinación experimental de parámetros dosimétricos

Como hemos visto, la medición del SAR es muy útil para determinar los posibles efectos biológicos de la exposición a radiaciones electromagnéticas, y de hecho se emplea como marcador de los límites recomendados de exposición a radiofrecuencia en los estándares internacionales (ICNIRP, 1998).

La medición de los campos eléctricos inducidos y la determinación de las temperaturas dentro de los tejidos vivos no resultan sencillas. Aunque es posible monitorizar de forma

práctica el valor de SAR promediada para un cuerpo entero, no ocurre lo mismo para el cálculo de SAR específico para un tejido.

Para la determinación experimental de SAR se han desarrollado varios métodos e instrumentos que pasamos seguidamente a describir:

a) *Medida de la tasa de absorción promediada (SAR_p):*

Para ello se emplean sistemas de medida del gradiente de temperatura antes y después de la exposición en fantomas y cadáveres de animales.

Un fantoma es un materia sintético que posee propiedades eléctricas equivalentes a las del tejido biológico real objeto de estudio (Sebastian Franco, J.L. y cols., 2006). Se instala en el fantoma una sonda de campo eléctrico capaz de detectar la intensidad de campo y/o una sonda térmica.

b) *Medida de la tasa de absorción específica local:*

La determinación de la SAR local se realiza mediante mediciones a través de sondas de campo eléctrico (E); o bien, de sondas térmicas capaces de medir el gradiente de temperatura en tejidos o cultivos de células in vitro.

Se han desarrollado diversos métodos que se emplean en determinar la distribución de la tasa de absorción específica (SAR_e) en un área plana en un volumen 3D:

- ❖ La lámina de cristal líquido sensible a la temperatura
- ❖ La cámara termográfica por infrarrojos.
- ❖ Las imágenes por resonancia magnética, que constituye la única técnica no invasiva (Marshall, I. y cols., 2006).
- ❖ La técnica de imágenes por luminiscencia.

Para la estimación del SAR en el laboratorio se utilizan métodos computacionales muy sofisticados entre los que destaca el sistema FDTD (Finite-Difference-Time-Domain). Además,

los resultados de los cálculos de FDTD pueden ser utilizados como guía para la colocación de las sondas de temperatura en los fantomas (D'Ándrea, J.A. y cols., 2007).

1.6.2. Marcadores de daño celular en tejidos biológicos

1.6.2.1. Proteínas del choque térmico

Rittosa en el año 1962, estudiando las glándulas salivares de la larva *Drosophila*, observó la presencia de un ensanchamiento en ciertas regiones de los cromosomas de la larva, que podían ser reproducidos mediante el aumento de temperatura. Unos años más tarde, Tissières (Tissières, A. y cols., 1974) relaciona la aparición de estos ovillos con el aumento en la síntesis de unas proteínas, que fueron llamadas “proteínas del choque térmico” (Heat shock proteins o HSPs).

Actualmente se ha demostrado que las HSPs son proteínas que desempeñan una función vital en el mantenimiento de la integridad celular tanto en condiciones normales como adversas. Cuando una célula es sometida a un estrés se produce una respuesta celular adaptativa caracterizada por la disminución en la producción de proteínas normales y por la activación de la síntesis de HSPs. Esta respuesta se conoce como “***respuesta al choque térmico***” y constituye uno de los mecanismos de supervivencia más antiguos que se han conservado a lo largo de la evolución. La respuesta al choque térmico se encuentra presente en prácticamente todos los organismos, incluidas bacterias y plantas (Santoro, M.G., 2000).

Aunque inicialmente se atribuía la producción de HSPs al aumento de temperatura, actualmente se sabe que existen multitud de tipos de estrés que pueden estimular la producción de las HSPs, tales como la hipoxia, la deprivación de glucosa, los metales pesados (Choi, Y.K. y cols., 2008), el etanol, las proteínas desnaturalizadas, los ultrasonidos, (Santoro, M. G., 2000), algunos fármacos (Batulan, Z. y cols., 2005); la microonda (Walters, T.J. y cols., 1998), etc.

El aumento en la producción de estas proteínas tiene una función fundamentalmente citoprotectora frente a estímulos adversos. Las HSPs ayudan a la célula a mantenerse biológicamente activas y estables en condiciones de estrés, constituyendo un verdadero mecanismo de defensa celular (Tynell M, y cols., 1993). Incluso se ha demostrado que la pre-exposición de la célula a una situación de estrés de baja intensidad confiere mayor capacidad de protección a la célula frente a un estrés severo posterior, siendo el grado de protección dependiente del nivel de síntesis de HSPs producida por el estímulo previo (*fenómeno de preacondicionamiento*) (Amin, V. y cols., 1995), lo que reafirma todavía más el efecto protector celular de las HSPs.

Las proteínas del choque térmico actúan también bajo condiciones normales, asegurando un adecuado estado de homeostasis e integridad celular. La mayoría de las HSPs funcionan como chaperonas moleculares, previniendo el plegamiento inapropiado de proteínas recién sintetizadas y evitando su unión con otras proteínas para formar agregados funcionalmente inactivos, y facilitando el transporte de polipéptidos a su correcta localización intracelular. Cuando una proteína se daña, las chaperonas moleculares facilitan su replegamiento o, si este daño es irreparable, favorecen su degradación. Cada vez existe mayor evidencia sobre la implicación de las HSPs en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson o el Alzheimer y se propone que alteraciones en las chaperonas podrían desencadenar fallos en el plegado de proteínas, lo que provoca el acúmulo de proteínas desnaturalizadas en las neuronas con su consecuente daño celular (Chen, S. y Brown, I.R.; 2007).

Las HSPs cuentan con una gran variedad de proteínas llamadas “clientes”, con las que se van a unir para poder desempeñar su función. En general, estas proteínas o sustratos son específicas para cada miembro de la familia de las hsp, y son las que van a determinar su función.

En los últimos años se ha implicado a las HSPs en otras funciones de vital importancia, como intervenir en los mecanismos de defensa del sistema inmunitario, lo que podría ser de gran valor para el desarrollo de medicamentos y vacunas (Srivastava, P.K., 2008). Así como, regular el ciclo celular, la proliferación celular, su diferenciación y la apoptosis. En este sentido, se está investigando el posible papel de las HSPs en el desarrollo del cáncer (French, P.W. y cols., 2000; Whitesell, L. y cols., 1998). De hecho, actualmente se está ensayando con tratamientos antitumorales que se basan en fármacos inhibidores de las Hsps, de esta manera, la pérdida de la función de protección celular aumentaría la sensibilidad de las células tumorales al estrés y esto facilitaría su eliminación mediante quimioterapia (Srivastava, P.K., 2008; Coss, R. A. 2005).

Las HSPs no se encuentran distribuidas de forma homogénea en el organismo, sino que en cada tejido e incluso en cada tipo celular predomina un tipo de Hsp, así como también se ha visto que la expresión de estas proteínas varía según el momento del desarrollo, del ciclo celular y del tipo de estrés (Walters, T.J., y cols., 1998; Chen, S. y Brown, I.R., 2007); A nivel del SNC la expresión de las HSPs es diferente en neuronas y en células de la glía, así como en las diversas estructuras del cerebro (Loones, M.T., y cols., 2000;). Por ejemplo, la expresión de las pequeñas hsp predominan en células gliales (Yun, S.J. y cols., 2002, Bechtold, D.A. y Brown, I.R., 2000), mientras que hsp90 se expresan fundamentalmente en neuronas en condiciones basales.

1.6.2.1.2. Clasificación de las proteínas del choque térmico

Podemos diferenciar dentro de esta gran familia de proteínas, aquellas que se encuentran en condiciones normales en la célula (*formas constitutivas*), de aquellas que se expresan ante situaciones de estrés celular (*formas inducibles*).

Se ha reconocido una forma de clasificar las HSPs según su peso molecular (kD); de esta forma, el espectro de proteínas varía desde las pequeñas HSPs de 20-30 kD hasta las grandes HSPs de 110 kD. Cada familia de chaperonas va a desempeñar una función específica principal que va a caracterizar a cada grupo (Tabla 6).

TABLA 6—Resumen de las principales familias de hsp (Katschinski, D.M., 2004).

<i>Familia de chaperonas</i>	<i>Función principal</i>
HSPs de gran peso molecular (110kDa)	Disolución de agregados proteicos, inhibición de la agregación de proteínas, termoresistencia.
Hsp90	Control del plegado y actividad de proteincinasas, receptor esteroideo, factores de transcripción; termotolerancia.
Hsp70	Plegado de proteínas de novo, efecto protector frente a desnaturalización por calor. Más abundante en células eucariotas
Hsp-60	Plegado de proteínas de novo; función inmunogénica como autoantígeno. Abundante en bacterias, cloroplastos y mitocondrias.
Pequeñas HSPs (20-30 kDa)	Plegado de proteínas, colabora con hsp70. Predomina en plantas

1.6.2.1.2. Hsp90

La proteína del choque térmico de 90 Kda, Hsp-90, es una de las proteínas más abundantes en muchos organismos celulares y especies animales en condiciones normales. Se ha estimado que HSP-90 constituye aproximadamente el 1-2% de todas las proteínas citosólicas celulares (Powers, M.V. y Workman, P., 2007).

En células humanas se han aislado 5 isoformas de Hsp90, que difieren en su localización intracelular:

a).-Las 2 formas citosólicas mayormente conocidas: *Hsp90 alfa* (forma inducible) y *Hsp90 beta* (forma constitutiva). Y recientemente ha sido aislada una variante citoplasmática, *Hsp90N* (Pearl, L.H. y cols., 2008; Sreedhar, A.S. y cols, 2004).

b).-*GRP94/gp96* que se localiza en el retículo endoplasmático.

c).-Una forma mitocondrial *TRAP1/hsp75* (tumor-necrosis-factor-receptor-associated protein 1). Estas dos últimas poseen una similitud con las formas citosólicas del 49 y 35% respectivamente.

Todas las isoformas excepto HSP90N poseen una estructura general similar, que consiste en:

a)- un *dominio N-terminal con actividad ATPasa*, que le confiere actividad enzimática y cuya función fundamental es regular la actividad de hsp90. Cualquier mutación en esta región conlleva la incapacidad de hsp90 como chaperona molecular. Hsp90N difiere del resto de las isoformas en que su dominio N-terminal es mucho más corto y como consecuencia no posee actividad ATPasa (Powers, M.V. y Workman, P., 2007).

b)-un *dominio intermedio* implicado en la unión a proteínas-cliente.

c)-y un *dominio C-terminal* que favorece la homodimerización e interviene en la formación de complejos multiproteína hsp90 activos (Brown, M.A. y cols., 2007).

Pero además, cada isoforma de hsp90 representa diferentes papeles en el desarrollo y la diferenciación celular. Actualmente se sabe que hsp90 α es una proteína que se expresa fundamentalmente como forma inducible, mientras que hsp90 β se encuentra mayoritariamente como forma constitutiva (Tabla 7). Aunque la mayoría de las funciones con las que se le relaciona pueden desarrollarse ambas, cada una se relaciona mayoritariamente con una isoforma. La sobreexpresión de hsp90 α ha sido relacionada con la progresión de tumores, la regulación del ciclo celular y con la estimulación de factores de crecimiento vía tirosinkinasa.

Por otro lado, hsp90 β ha sido implicada en la adaptación celular a largo plazo (Sreedhar, A.S. y cols., 2004).

Isoforma	Función Específica	Estado de mayor expresión
HSP90 α	Promueve el crecimiento Regulación del ciclo celular Citoprotección Inducción bajo condiciones de estrés	Inducible
Hsp90 β	Desarrollo embrionario temprano Maduración de células germinales Estabilización del citoesqueleto Transformación celular Transducción de señal Adaptación celular a largo plazo	Constitutiva

Tabla 7.- *Diferencias en la función y la expresión de las diversas isoformas de hsp90 (Sreedhar, A.S., y cols., 2004)*

Hsp90 se expresa mayoritariamente a nivel citoplasmático y una pequeña proporción en el núcleo celular. Bajo situación de estrés térmico la expresión en el núcleo aumenta ligeramente (Van Bergen en Henegouwen, P.M., y cols., 1987).

Aunque todavía se desconoce con claridad cuál es la función de HSP90, se sabe que tiene actividad de chaperona molecular. Mediante esta actividad, HSP90 mantiene la estabilidad de proteínas citosólicas bajo condiciones normales, realiza el triage de proteínas desnaturalizadas bajo situaciones de estrés, evitando su agregación y actúa como potenciador de la evolución genética al impedir que se pongan de manifiesto cambios genéticos que afectarían negativamente a la función celular (Sangster, T.A. y cols., 2008). Además se está estudiando su posible implicación en determinadas enfermedades, como enfermedades autoinmunes,

neurodegenerativas, y particularmente en el desarrollo del cáncer en donde se están realizando ensayos terapéuticos con fármacos inhibidores de Hsp90 con resultados esperanzadores (Taylor, D.M. y cols., 2007; Rodina, A. y cols, 2007; Pearl, L.H.y cols., 2008; Powers, M.V. 2007; Waza M, y cols., 2006).

La función de hsp90 en el sistema nervioso central todavía es desconocida, sin embargo, dada su abundante expresión neuronal en condiciones fisiológicas se cree que desarrolla un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso y en el mantenimiento de la homeostasis celular (Gass, P. y cols., 1994; Takaya, K. y cols, 2003). En concreto, se cree que Hsp90 interviene en la migración neuronal dado que su expresión se ve aumentada en la fase G₀ del ciclo celular durante la diferenciación del neuroectodermo (Walsh, D. y cols., 1997, Sidera, K. y cols., 2004).

Hsp90 no es capaz de funcionar de manera autónoma, sino que precisa unirse a co-chaperonas para constituir un complejo multiproteico funcional. La mayoría de estas co-chaperonas regulan la actividad ATPasa del extremo N-terminal de hsp90 (Katschinski, D. M., 2004; Brown, M.A., y cols., 2007). A través de esta unión funciona como chaperona molecular para catalizar la maduración o la activación de más de 100 proteínas, conocidas como “proteínas cliente”, las cuáles intervienen en los mecanismos de regulación celular. La lista de proteínas-cliente es muy amplia y se encuentra en continua expansión. Pearl (Pearl, L.H., y cols., 2008) las clasifica en tres grandes grupos:

- 1) Las protein-kinasas, que constituye el grupo más prevalente.
- 2) Los factores de transcripción.
- 3) Y por último describe a las proteínas emergentes de la replicación viral y a un grupo de proteínas-receptoras intracelulares relacionados con la inmunidad innata.

Se ha estudiado con gran detalle la función de hsp90 en la regulación del receptor esteroideo, de gran importancia en la regulación de múltiples procesos fisiológicos (Grad, I. y Picard, D., 2007).

1.6.2.1.2.1.-Expresión de Hsp90 en el tejido cerebral en condiciones normales y de estrés

Se ha demostrado que Hsp-90 se expresa de forma abundante en condiciones normales en muchas poblaciones neuronales en el cerebro de rata, siendo mayor su expresión en tejido neural que en tejido no neural. HSP-90 se ha detectado en gran cantidad en diversas áreas encefálicas: neocortex, sistema límbico (hipocampo, complejo amigdalario, corteza piriforme, entorrinal, angular y olfatoria), tálamo e hipotálamo, estriado, cerebelo, y núcleos del troncoencéfalo; lo que sugiere la importancia de Hsp90 en el normal funcionamiento de las neuronas en el SNC (Gass, P., y cols., 1994; D'Souza, S.M. y Brown, I.A., 1998).

El estudio de la expresión de Hsp90 durante el desarrollo neuronal en embriones de roedor, evidencia un aumento de su expresión en diversas áreas encefálicas, por lo que se cree que interviene en el ciclo celular, los procesos de crecimiento y diferenciación, y en la migración neuronal (Sidera, K., y cols., la expresión de hsp90 α y β varía según el estadio del desarrollo, detectándose la máxima expresión de Hsp90 α en algunos núcleos cerebrales hipotalámicos, lo que probablemente sea debido a la relación de hsp90 α con el normal funcionamiento del complejo-receptor esteroideo (Loones, M.T. y cols., 2000; Furay, A.M., y cols., 2006). Esta diferencia de expresión indica que ambas isoformas presentan un papel diferente en el desarrollo del SNC, como ya comentamos anteriormente.

A nivel del SNC, Hsp90 se expresa, en condiciones normales, fundamentalmente en neuronas, no detectándose en población glial. Su localización preferentemente es en el citoplasma neuronal, encontrándose poca cantidad en los procesos neuronales (dendritas) y en el

núcleo celular; pero nunca en zonas de sinapsis (Gass, P. y cols., 1994; D'Souza, S.M. y Brown, I.R., 1998).

La respuesta al shock térmico ha sido ampliamente estudiada en el tejido cerebral, en respuesta a multitud de estímulos como la hipertermia, la isquemia, las enfermedades neurodegenerativas, y las lesiones traumáticas. Para ello se ha estudiado la expresión de marcadores biológicos como las HSPs para determinar el grado de estrés celular. En relación con hsp90, bajo condiciones de hipertermia, se ha evidenciado un importante incremento de la expresión de Hsp90 en el SNC en diversos estudios animales (Ramaglia, V., y cols., 2004 a,b).

También se ha detectado un aumento en la expresión de hsp90 tras un estímulo excitotóxico, expresándose hsp90 en células gliales y demostrándose la existencia de una reacción glial frente al daño neuronal en la que se encuentra implicada hsp90, y cuyo papel todavía es desconocido (Jeon, S.G. y cols., 2004).

Se ha confirmado la existencia del efecto de precondicionamiento de las hsp's a nivel neuronal. La aplicación de un estímulo térmico en cultivos neuronales protege parcialmente a la célula de la apoptosis y también del daño celular secundario a agentes tóxicos (Mailhos, C. y cols., 1993).

1.6.2.2 c-Fos

La proteína c-Fos es el producto de la transcripción del proto-oncogen c-Fos. Este gen pertenece a la familia de los llamados genes inmediatos tempranos. C-Fos constituye actualmente el marcador biológico funcional más ampliamente utilizado en el SNC por varias razones: su expresión en el cerebro en condiciones normales es baja, c-fos es estimulada en respuesta a multitud de señales extracelulares, su respuesta es transitoria, y por último, la detección de c-fos en el laboratorio no resulta muy complicada (Kovács, K.J., 2008). Es por ello, que se ha empleado como un marcador de estrés neuronal, de manera que es capaz de

detectar qué neuronas responden a un estímulo externo, y de esta manera ha sido posible describir mapas funcionales de respuesta del SNC frente a un estrés agudo (Finnie, J.W., y cols., 2006), así como diversos circuitos neurales como el de termorregulación (Bachtell, R.K. y cols., 2003), o el desarrollo ontogénico del SN (Vendrell, M. y cols., 1998).

En el SNC, el proto-oncogen c-Fos puede ser activado por multitud de estímulos, como estímulos acústicos, térmicos, visuales y somatosensoriales (Papadopoulos, G.C., 1993; Cham J.L. y Badoer, E., 2007; Liu, J. y cols., 2007), fármacos (Cenci, M.A. y cols. 1999, Novikova, N.S. y cols., 2004; Szakács, R. y cols., 2008; Wegener, N. y Koch, M., 2008), citokinas (Spitznagel, H., y cols., 2001; Konsman, J.P., y cols., 2008), neurotransmisores y neuromoduladores (Sun, W.L. y cols., 2008), y por la exposición a campos electromagnéticos. (Rao, S. y Henderson, A., 1996, Morrissey, J.J. y cols., 1999).

La expresión de la proteína c-Fos en respuesta a un estímulo agudo es transitoria, con un pico de c-Fos RNAm aproximadamente a los 30m y de la proteína c-Fos entre los 90-120 minutos tras la estimulación (Kovács, K.J., 2008). Posteriormente el nivel va decreciendo durante varias horas hasta llegar a normalizarse.

La expresión de c-Fos de forma constitutiva a nivel neuronal es baja, y se encuentra repartida de forma heterogénea. Se ha detectado mayor expresión en condiciones basales en diversas áreas encefálicas sin poder aclarar la causa hasta el momento. En el hipotálamo, se ha descrito mayor expresión de c-Fos en las áreas preóptica y lateral y en el núcleo supraquiasmático (Kovács, K.J., 2008).

Se ha observado que los niveles de RNAm c-Fos en corteza cerebral, septum e hipocampo son mayores tras un estímulo agudo que tras estímulos repetidos. Este efecto se le conoce como “periodo refractario” (Cirelli, C. y Tononi, G., 2000).

c-Fos se incrementa a nivel neuronal en respuesta al estímulo con radiación microonda, no solo a dosis térmicas (Mickley, G.A. y cols., 1994; Morrissey RW, y cols., 1999) sino también a dosis atérmicas (López-Martín, E. y cols., 2008). Los mecanismos que subyacen a la interacción de las células con la radiación microonda todavía no se conocen. En base a estudios realizados con c-Fos que apoyan otras investigaciones, se postula que la radiación microonda interacciona a nivel de la membrana celular desencadenando mecanismos de transducción de señal, entre los que interviene la inducción del flujo de Ca^{++} (Rao, S., y Henderson, A.S., 1996).

Entre las áreas neuroanatómicas estudiadas que han mostrado mayor expresión de c-fos tras la estimulación con microonda y por tanto probablemente son más sensibles al efecto de la radiación podemos citar las áreas corticales y áreas hipocampales sobretodo Giro dentado (Morrissey, J.J. y cols., 1999; López-Martín, E., y cols., 2008).

1.7.- DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS ANATÓMICAS CEREBRALES ESTUDIADAS EN ESTA TESIS

1.7.1. Área hipotalámica

El hipotálamo es la región más caudal del diencefalo, separada del subtálamo por el plano que teóricamente pasa tangente a los pilares anteriores del trígono. Constituye un centro integrador de las respuestas fisiológicas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis del organismo. Tiene como funciones principales, el mantenimiento del medio interno corporal (homeostasis) y hormonal, interviene en los patrones de conducta, en el sistema emocional y en la memoria. Sus efectos se ejercen a través del sistema vegetativo, del sistema endocrino, del sistema motor y del sistema límbico (Young, P.A., 2000).

La región hipotalámica está constituida por distintas agrupaciones neuronales ampliamente interrelacionadas. La delimitación anatómica exacta de la mayoría de los núcleos hipotalámicos resulta difícil, dado que se presentan numerosos núcleos en un reducido espacio.

Para facilitar su descripción la región hipotalámica ha sido dividida en cuatro áreas: *preóptica*, *supraóptica*, *tuberal* y *mamilar*, a su vez cada una de estas áreas se dividen en tres regiones: *periventricular* (inmediata a la pared del tercer ventrículo), *medial*, y *lateral*, estas últimas separadas por un plano para-sagital que pasa a través del pilar anterior del trígono (Figura 6.)

a) **Área preóptica:** Constituye la sustancia gris más anterior del tercer ventrículo. Encontramos tres grupos nucleares: El preóptico periventricular que circunda las paredes del tercer ventrículo, el preóptico medial situado por fuera del anterior, y el preóptico lateral que es el más externo.

b) **Área supraóptica.:** Situada por encima del quiasma de los nervios ópticos. Hallamos tres grupos nucleares: El núcleo supraóptico periventricular, el grupo supraóptico medial integrado por los núcleos supraóptico, ubicado sobre el quiasma, y el núcleo paraventricular localizado por encima del anterior en el espesor de la pared del ventrículo a nivel del pilar anterior del trígono ,y el grupo nuclear supraóptico lateral por fuera de los anteriores.

c) **Área tuberal:** Distinguimos en esta región tres grupos nucleares: El grupo nuclear tuberal periventricular, el grupo nuclear tuberal medial formado por el núcleo tuberal arciforme a nivel del infundíbulo, el núcleo tuberal ventromedial, y el núcleo tuberal dorso medial, y por último el grupo nuclear tuberal lateral.

c) **Área mamilar:** En esta región se hallan el grupo nuclear mamilar periventricular, el grupo nuclear mamilar medial formado por los núcleos mediales del tubérculo mamilar y el núcleo hipotalámico dorsal, y el grupo nuclear mamilar lateral.

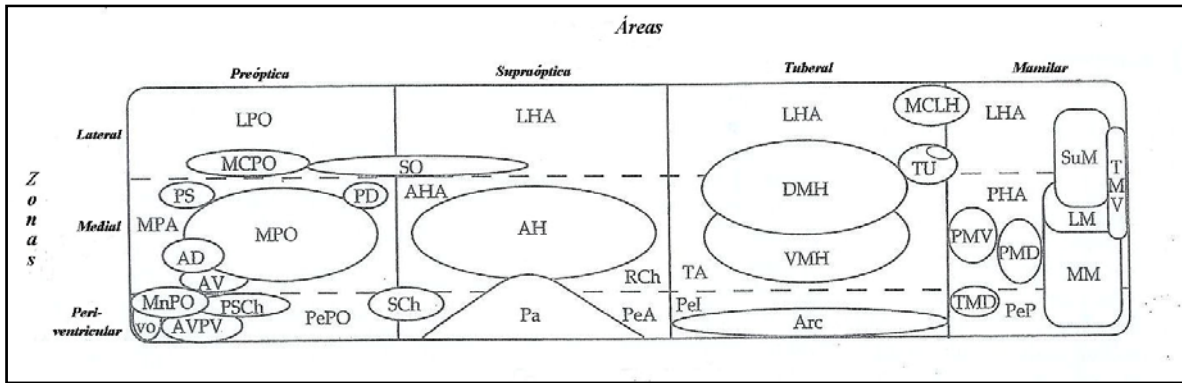


Figura 6. Organización del hipotálamo. Esquema representativo de la organización morfológica de las áreas (a) y los núcleos (n) hipotalámicos (n. preóptico lateral (LPO), n. preóptico magnocelular (MCPO), a. preóptica medial (MPA), n. preóptico medial (MPO), n. preóptico anterodorsal (AD); n. preóptico anteroventral (AV); n. parastrial (PS), n. preóptico posterodorsal (PD), n. supraóptico (SO); a. hipotalámica lateral (LHA), a. hipotalámica anterior (AHA), n. hipotalámico anterior (AH), a. retroquiasmática (RCh), n. periventricular anterior (PeA), n. supraquiasmático (SCh), n. paraventricular (Pa), n. Tuberal (TU), a. hipotalámica lateral (LHA), a. Tuberal (TA), n. ventromedial (VMH), n. dorsomedial (DMH), n. intermedio periventricular (Pel), n. arcuato (Arc), n. tuberomamilar ventral (TMV), n. magnocelular de LHA (MCLH), a. hipotalámica lateral (LHA), a. hipotalámica posterior (PHA), n. premamilar dorsal (PMD), n. premamilar ventral (PMV), n. mamilar medial (MM), n. mamilar lateral (LM), n. supramamilar (SuM), n. periventricular posterior (PeP), n. tuberomamilar dorsal (TMD). Paxinos.

1.7.1.1. Aferencias del hipotálamo:

1.- Fibras ascendentes procedentes del tronco cerebral:

a) Las que provienen de los núcleos ventrales y dorsales de la calota mesencefálica, lo hacen a través del pedúnculo mamilar y llegan al núcleo mamilar lateral.

b) Las que provienen de la sustancia gris periacueductal y de los núcleos redondo y sensitivo dorsal lo hacen a través de la cintilla longitudinal dorsal de Schutz.

c) Las que provienen de la formación reticular central de la calota mesencefálica lo hacen a través de las fibras ascendentes del fascículo medial del cerebro anterior y llegan a la región caudal y dorsal del hipotálamo.

d) También llegan fibras que provienen de los núcleos del rafe mesencefálicos, del locus ceruleus, y del núcleo solitario.

2.- Fibras que proceden de la retina: Fibras retinohipotalámicas.

Se originan en las células ganglionares de la retina y se proyectan a los núcleos supraópticos del hipotálamo de ambos lados a través de las vías ópticas. Estas aferencias son responsables del reflejo fotogonadotrófico que consiste en que la luz estimula la producción hormonal a través del hipotálamo.

3.- Fibras que provienen de los núcleos de la línea media y del núcleo dorsomedial del tálamo.

4.- Fibras procedentes de la corteza cerebral:

a) Fibras del triángulo, que se originan en el hipocampo y en los núcleos del septum y llegan a los núcleos preópticos y los núcleos mamilares mediales. Esta aferencia forma parte del circuito de Papez.

b) Fibras que se originan en la corteza piriforme, en el tubérculo olfatorio y en el núcleo amigdalino y llegan al hipotálamo medial, y también al lateral, a través de la estría terminal y de la vía amigdalofugal. A través de estas aferencias le llegan al hipocampo aferencias olfatorias directas.

c) Fibras que provienen de la corteza orbitaria y del lóbulo de la ínsula a través del fascículo medial del cerebro anterior.

5.- Las neuronas del hipotálamo poseen receptores capaces de ser estimulados por las condiciones físicas y bioquímicas de la sangre. por ello los vasos son una de las aferencias al hipotálamo, el cual responde de forma refleja a la composición bioquímica de la sangre como es el nivel hormonal y la glucemia, y a las características biofísicas como son la osmolaridad y la temperatura.

6.- Las fibras aferentes somáticas principalmente de las zonas erógenas cutáneas envían colaterales al hipotálamo.

1.7.1.2 Eferencias del hipotálamo:

1.- Hacia la corteza cerebral: Envía eferencias directas hacia la región septal, y el tubérculo olfatorio a través del fascículo medial del cerebro anterior.

2.- Hacia el grupo nuclear anterior del tálamo a través del fascículo mamilotalámico de Vicq D'Azir. Este fascículo forma parte del circuito de Papez.

3.- Existen fibras que desde el hipotálamo se proyectan sobre el núcleo dorsomedial del tálamo y a través de este núcleo se conecta el hipotálamo con la corteza prefrontal.

4.- El hipotálamo envía fibras eferentes hacia los núcleos de la formación reticular del tronco encefálico a través del haz mamilotegmentario, y hacia los núcleos vegetativos de los pares craneales a través de la cintilla longitudinal dorsal de Schutz.

5.- Existen fibras que desde el hipotálamo conectan con las células de la región intermedia de la médula espinal, estas fibras influyen sobre las funciones vegetativas de la médula espinal.

6.- Eferencias hacia la hipófisis.

El hipotálamo controla la glándula hipófisis de dos formas diferentes: Sobre la neurohipófisis ejerce un control neural a través del tracto hipotálamo hipofisario, y sobre la adenohipófisis ejerce su acción a través del sistema porta hipofisario.

a) Tracto hipotálamo-hipofisario (Supraóptico-hipofisario).

Los núcleos supraóptico y paraventricular contienen grandes células neurosecretoras que producen dos hormonas: la hormona antidiurética y la ocitocina. Las neuronas de estos núcleos producen las hormonas que unidas a una proteína transportadora, la neurofisisina, descienden por los axones de las células productoras hacia el lóbulo posterior de la hipófisis donde son almacenadas y liberadas hacia la sangre a través de capilares fenestrados... La función principal de la hormona antidiurética (ADH o vasopresina) es la de aumentar la

reabsorción de agua en el riñón. La ocitocina provoca la contracción del músculo liso uterino y mamario.

Los núcleos supraóptico y para ventricular también contienen sustancias biológicamente activas como la encefalina, la colicistoquinina, el glucagón, la dinorfina y la angiotensina.

b) Sistema porta hipofisario.

Las neuronas de los núcleos mediales del tuber sintetizan hormonas denominadas factores liberadores y factores inhibidores hipotalámicos, los cuales son enviados hacia la eminencia media a través de los axones que forman el tracto tubero-hipofisario, que termina en las asas pericapilares de la eminencia media. Estos capilares venosos confluyen para formar venas que se dirigen hacia el lóbulo anterior de la hipófisis. En este lóbulo bifurcan y dividen sucesivamente para formar capilares venosos y sinusoides que se sitúan entre las células del lóbulo anterior hipofisario. Este sistema, denominado porta hipofisario, permite el transporte de los factores liberadores e inhibidores desde el tuber hipofisario hasta el lóbulo anterior de la hipófisis. El sistema porta hipofisario es por lo tanto un sistema de transporte que comienza en capilares que forman venas y que a su vez vuelven a formar capilares sinusoidales.

1.7.1.3. Núcleos hipotalámicos estudiados en esta tesis

1.7.1.3.1 Núcleo arcuato (Arc)

El núcleo arcuato (Arc) constituye la parte más caudal de la parte tuberal de la zona periventricular del hipotálamo. Se extiende rostral al receso infundibular y discurre a lo largo de la pared de dicho receso. Se distinguen dos subdivisiones: una parte dorsomedial de células pequeñas y una parte ventrolateral de células medianas. Al igual que el resto de las áreas de la zona periventricular, el núcleo Arc participa en la función neuroendocrina del hipotálamo. La mayoría de las neuronas de Arc contienen hormonas hipofisiotrópicas que serán vertidas en el sistema portahipofisario para llegar a alcanzar la glándula pituitaria (Figura 7).

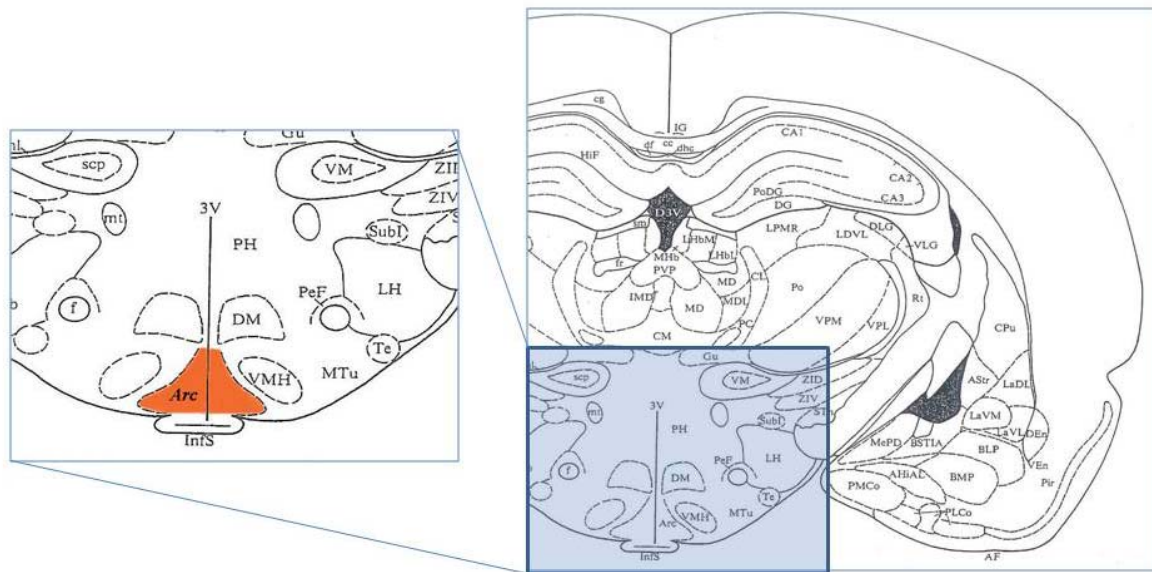


Figura 7. Corte anatómico del cerebro de rata en donde se muestra el área hipotalámica con el núcleo Arcuato (Arc) (coordenadas según Paxinos and Watson: Interaural 5.40 mm; Bregma: -3.60 mm).

1.7.1.3.1 Núcleo paraventricular (Pa)

El núcleo paraventricular (Pa) se extiende desde el surco hipotalámico y cruza la cara medial de la columna anterior del fórnix (Williams, P.L. y Warnick, R., 1985). Este núcleo constituye una de las principales áreas de integración de la función neuroendocrina (Herman, J.P. y cols., 2002). La estructura citoarquitectónica del n. Pa es compleja, ya está constituida por células de diversos tamaños, formas y conexiones. N. Pa forma parte de dos sistemas diferenciados: el sistema neurosecretor magnocelular y el sistema neurosecretor parvocelular.

- a) La mayoría de neuronas del núcleo Pa se denominan células neurosecretoras magnocelulares ya que se proyectan hacia la neurohipófisis y sintetizan neurohormonas como la vasopresina (AVP) y la oxitocina (OX) constituyendo el sistema hipotálamo-neurohipofisario. AVP interviene en la regulación del balance hídrico y la presión sanguínea.

- b) El sistema neurosecretor parvocelular lo constituyen multitud de núcleos hipotalámicos. También es conocido como sistema tuberohipofisario por la gran implicación del núcleo arcuato cuya localización se sitúa en el suelo del hipotálamo (tuber cinereum). Este sistema regula la secreción de hormonas del lóbulo anterior de la hipófisis (como la hormona de crecimiento, ACTH, y la hormona luteinizante).

El núcleo Pa está dividido en cuatro subregiones (Figura 8):

- N. hipotalámico paraventricular lateral magnocelular (PaLM)
- N. hipotalámico paraventricular medial parvocelular (PaMP)
- N. hipotalámico paraventricular ventral (PaV)
- N. Hipotalámico paraventricular dorsomedial (PaDC).

1.7.1.3.3 Área hipotalámica lateral (LH):

La zona lateral del hipotálamo participa en el procesamiento de la información sensorial y del comportamiento asociado al hambre, la sed, la agresión y la reproducción.

LH se encuentra dividido en tres regiones: *anterior (LHa)*, *tuberal (LHt)* y *mamilar (LHp)*. LHa continúa al área preóptica lateral (LPO) y se encuentra bordeada medialmente por el área hipotalámica anterior y por las columnas descendentes del fórnix. Lateralmente se une a la sustancia innominada y la amígdala. LHa pasa a ser LHt a nivel tuberal. LHt se encuentra delimitado lateralmente por el tracto óptico, la cápsula interna y más caudalmente el núcleo subtalámico. El núcleo tuberal (TU) está inmerso en LH. A nivel del complejo mamilar LHt pasa a constituir LHp. Medialmente LHp se encuentra delimitado por el fórnix, el tracto mamilotalámico y el área hipotalámica posterior (Figura 8).

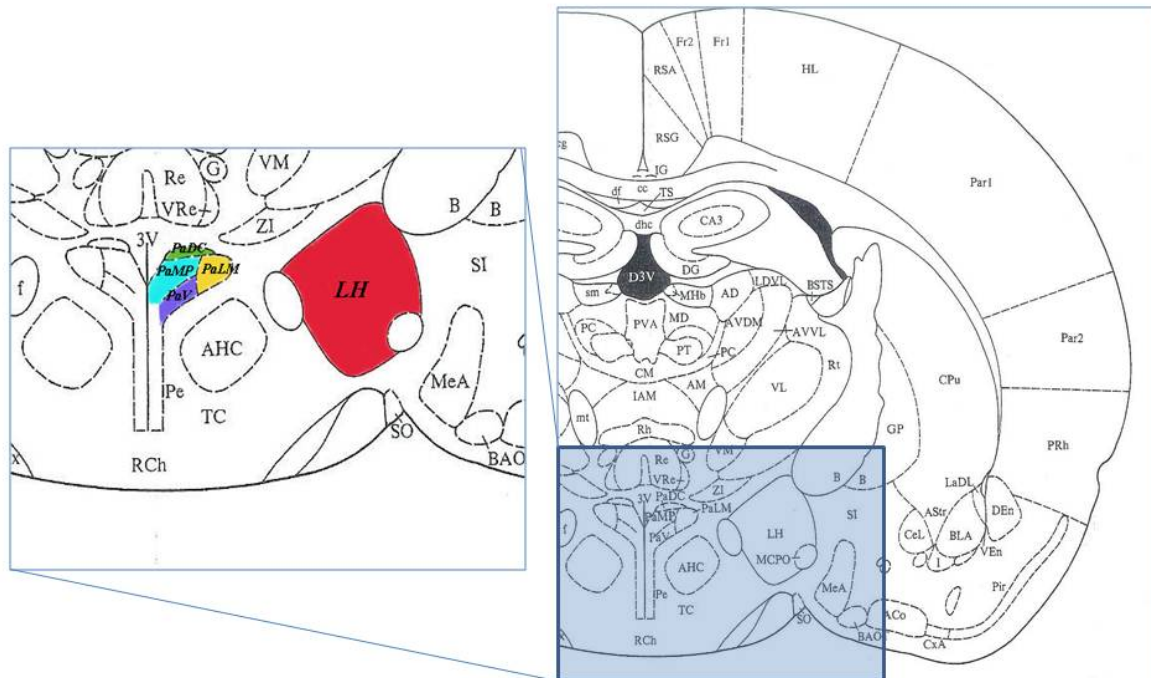


Figura 8.- Corte anatómico del cerebro de rata en donde se muestra el área hipotalámica con los núcleos paraventricular (Pa), y LH. (coordenadas según Paxinos and Watson: Interaural 7.20 mm; Bregma: -1.80 mm).

1.7.2 Áreas corticales

La corteza constituye la estructura más extensa y funcionalmente significativa del telencéfalo. Se desarrolla a partir de la bóveda palial de la vesícula telencefálica.

Desde el punto de vista filogenético, el isocórtex es una estructura de aparición relativamente tardía. El esbozo de isocórtex se manifiesta en una forma incompleta en los reptiles, que esencialmente sólo tienen allocórtex, y solo avanza hacia su constitución definitiva con 6 capas en los mamíferos (Puelles López, L. y cols., 2008).

La corteza en los mamíferos está formada por:

- a) isocórtex (o neocórtex).
- b) allocórtex, que se corresponde con el paleocórtex (area olfatoria) y el archicórtex (área límbica) (Figura 9).
- c) Y por un área de transición entre allocórtex e isocórtex: mesocórtex. Las áreas 2-3 de la corteza cingulada anterior con el área infralímbica del cortex medial y el cortex retrosplenial forman el límite entre alo e isocórtex en el plano medial y lateral; mientras que en la cara lateral y anterior el isocórtex está delimitado por la corteza insular agranular y por las áreas orbitofrontales.

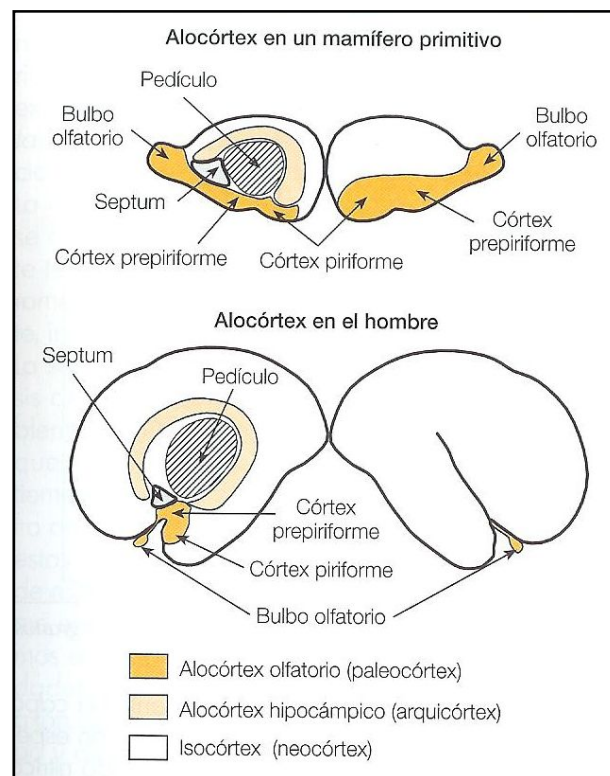


Figura 9.- Esquema del Allocórtex (Puelles López, L. 2008)

1.7.2.1. Isocórtex

El isocórtex posee 6 capas enumeradas con dígitos romanos desde la superficie palial hacia adentro (I-VI). Dependiendo de su aspecto citoarquitectónico reciben además los siguientes nombres (Figura 10):

- **I capa molecular** (posee poca celularidad)
- **II capa granular externa** (predominio de células pequeñas, estrelladas o piramidales).
- **III capa piramidal externa** (mayoría de células piramidales pequeñas).
- **IV capa granular interna** (mayoría de células estrelladas)
- **V capa piramidal interna** (células piramidales grandes)
- **VI capa multiforme** (células grandes y pequeñas de varias formas).

Bajo la capa VI se encuentra la sustancia blanca que limita directamente con los ventrículos laterales o los núcleos telencefálicos.

El isocórtex está organizado en columnas cilíndricas radiales a través de las 6 capas, llamadas *columnas corticales*. Las dimensiones de las columnas son relativamente constantes en los mamíferos por lo que se considera como módulos unitarios, de manera que el número de columnas crece al aumentar la superficie cortical durante la evolución. Lo que unifica una unidad columnar es que todas sus neuronas estarían implicadas en una misma tarea.

Los tipos celulares más característicos del isocórtex son las células piramidales y las células estrelladas, ambas caracterizadas por tener espinas dendríticas y ser excitatorias.

- a) Las **células piramidales** son células de proyección. Poseen un cuerpo en forma de pirámide con una larga dendrita apical extendida hacia la capa I cortical y varias dendritas basales que divergen lateralmente en varias direcciones. El axón desciende hasta la sustancia blanca, emitiendo por el camino colaterales a otras

células piramidales circundantes, constituyendo redes interpiramides. Las células piramidales aparecen típicamente en las capas II, III, V y VI, con predominio en las capas III y V. Su tamaño va creciendo de la superficie a la profundidad. Dependiendo de su tamaño varia el destino de sus axones: las pequeñas (capas II y III) emiten *proyecciones corticocorticales*; las más grandes (capa V) emiten *proyecciones subcorticales*; y por último, las células piramidales de la capa VI proyectan específicamente al *claustró lateropalial o al tálamo*.

- b) Las **células estrelladas espinosas** son interneuronas excitatorias cuyo axón se arboriza sinápticamente dentro de la propia columna cambiando o no de capa. Abundan en las capas granulares (II y IV); y son las que realizan el procesado básico de la información aferente a cada columna.

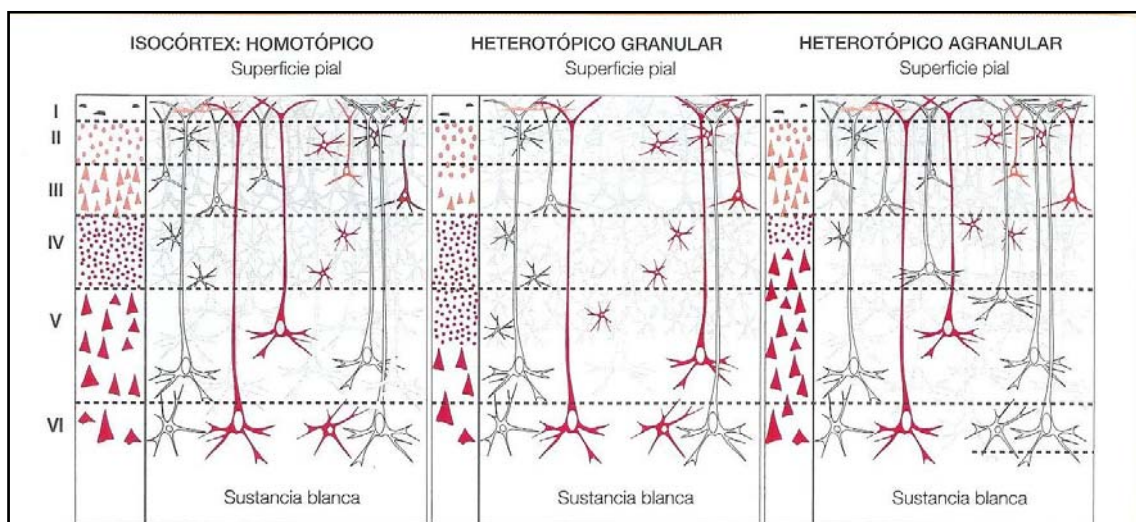


Figura 10.-Esquema representativo de la citoarquitectura del isocórtex (Puelles López, L., 2008).

El isocórtex está constituido por las regiones frontal, parietal, temporal y occipital. Pasaremos a describir la corteza parietal por ser una de las áreas estudiadas en esta Tesis.

1.7.2.2 Región Parietal

La corteza parietal se encuentra dividida en 4 áreas: **Par 1** es la parte más amplia y se encuentra delimitada ventrocaudalmente por la **Par2** y dorsomedialmente por **FL** (*forelimb area*) y **HL** (*hind-limb area*) (Figura 11).

Par1, FL y HL se corresponden con la corteza somatosensorial primaria (SmI) y Par2 con la corteza somatosensorial secundaria (SmII).

- a) La **corteza somatosensorial o somestésica primaria** ocupa toda la circunvolución postcentral desde la cara interhemisférica hasta el opérculo parietal, y se extiende anteroposteriormente desde el fondo del surco central hasta el fondo del surco postcentral, incluyendo las áreas 4 de Brodmann, las áreas paralelas 3a, 3b, 1 y 2. Recibe aferencias de los núcleos ventral intermedio (VI) y ventral posterior (VP) del hipotálamo vehiculizadas por el tracto espinotalámico, el lemnisco medial y los tres tractos trigeminotalámicos. Las señales propioceptivas llegan al área 3a desde el núcleo VI; y las señales táctiles y termoalgésicas llegan al área 3b desde el núcleo VP. Además, el área 2 se ha relacionado con alteraciones en la percepción de la forma y tamaño de los objetos, y el área 1 se ha relacionado con alteraciones en la textura de los objetos. Las conexiones talamocorticales son contralaterales a excepción de la zona de proyección trigeminal en el opérculo parietal anterior, que lleva señales bilaterales.
- b) La **corteza somestésica secundaria** es un área parietal asociativa que se sitúa en la parte trasera del opérculo parietal y recibe datos bilaterales de todo el cuerpo. Al contrario que SMI, SmII recibe aferencias bilaterales.

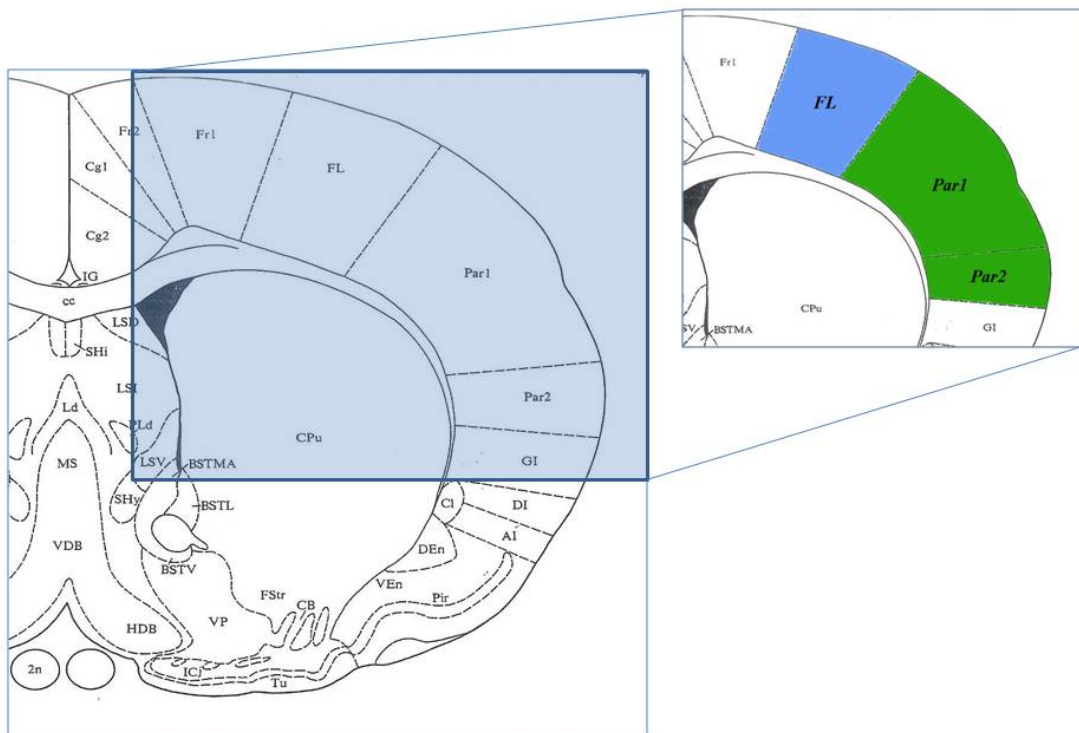


Figura 11. Corte anatómico del cerebro de rata en donde se muestra el área parietal Pa con sus respectivas secciones: FL, Par 1, Par2 (coordenadas según Paxinos and Watson: Interaural 9.20 mm; Bregma: 0.20 mm).

1.7.2.3 Corteza entorrinal

La corteza entorrinal pertenece al mesocórtex hipocámpico. Se localiza en el lóbulo temporal, en la circunvolución situada entre la cisura hipocámpica y la cisura colateral (Figura 12).

En el hombre, la corteza entorrinal se encuentra muy desarrollada sólo en la porción rostral, alrededor del uncus. En su porción posterior se va adelgazando hasta quedar limitada al labio inferior de la cisura hipocámpica.

Histológicamente está constituida por 5 capas celulares; las neuronas de las capas II y III presentan acúmulos densos a modo de islotes que le dan un aspecto histológico característico.

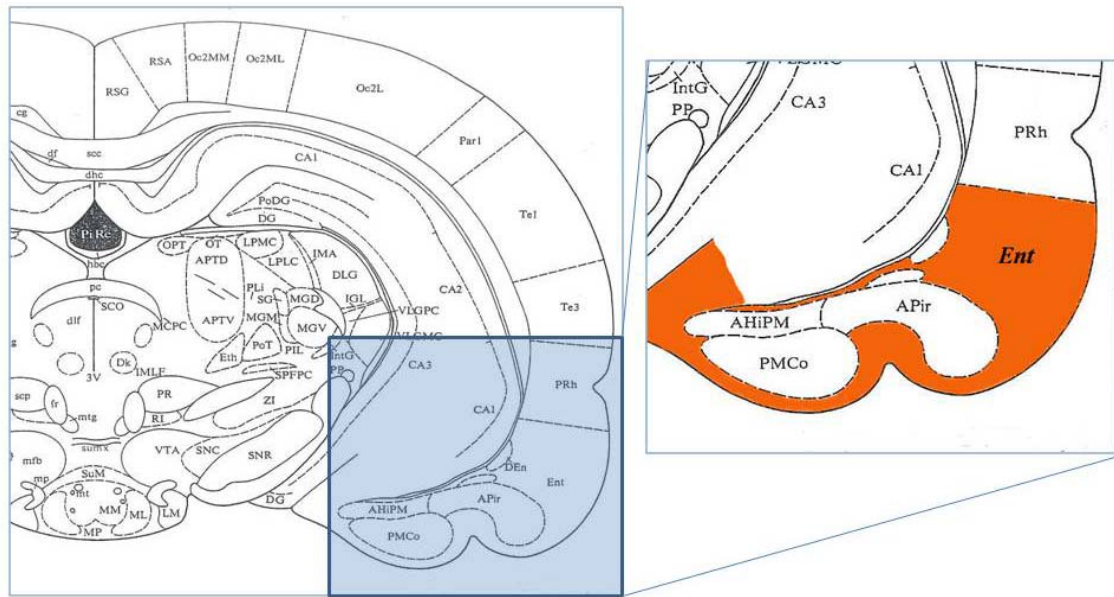


Figura 12. Corte anatómico del cerebro de rata en donde se muestra la corteza entorrinal. (coordenadas según Paxinos and Watson: Interaural 4.20 mm; Bregma: -4.80 mm).

1.7.3. Formación hipocámpica

El hipocampo es una estructura telencefálica bilateralizada y simétrica que forma parte del sistema límbico. Desde el punto de vista filogenético es una estructura cortical antigua (archicortex) que se repliega sobre sí misma y se sitúa en la cara interna de los hemisferios cerebrales.

La organización anatómica del hipocampo difiere poco según las especies, esta estabilidad filogenética sugiere que es una estructura base para el funcionamiento del sistema nervioso central.

El hipocampo de los mamíferos deriva del área de superposición mediana situada sobre la cara interna de los hemisferios cerebrales de algunos reptiles. En el seno de esta área, la superposición de una capa granular superficial y de una capa piramidal profunda podría ser considerado como el esbozo homólogo de la disposición del hipocampo de los mamíferos.

La flexión telencefálica explica la forma en herradura del limbo hipocámpico y la disposición de las diversas capas celulares en el hipocampo de los mamíferos inferiores.

El desarrollo del cuerpo calloso, provoca que en los mamíferos superiores se atrofie la parte dorsal del hipocampo, manteniéndose en la parte retrocallosa y en el lóbulo temporal.

En los mamíferos superiores la disposición anular del limbo hipocámpico solamente es bien apreciable en el período embrionario. La porción preconmisural no persiste más que en algunos mamíferos inferiores. La porción interhemisférica dorsal casi desaparece por el desarrollo del cuerpo calloso, persistiendo únicamente el indusium gris y la fasciola cinérea.

En el hombre la porción pre-conmisural está reducida al estado de vestigio. La porción supraconmisural queda reducida al indusium gris, a la estria longitudinal medial de Lancisi y a la estria longitudinal lateral de Lancisi. La porción retroconmisural es la región límbica hipocámpica bien desarrollada, detrás del cuerpo calloso y en el lóbulo temporal.

La porción retrocomisural es la que habitualmente denominamos hipocampo. Es de mayor tamaño en el hombre que en los primates, y en estos mayor que en otros mamíferos, por lo que se sugiere su importancia, vinculada a la facultad de valorar la experiencia, seleccionando contenidos a grabar en la memoria, generando mapas cognitivos.

El hipocampo tiene una superficie interior situada en la cavidad ventricular que denominamos asta de Ammon, y una superficie exterior en la que podemos observar la cisura del hipocampo, el giro dentado o cuerpo abollonado y la fimbria del hipocampo o pilar posterior del trígono. Rodeando a estas formaciones, se hallan la corteza entorrinal y el parahipocampo o 5ª circunvolución temporal (Figura 13).

En los mamíferos consiste principalmente en dos conjuntos celulares distintos que adoptan uno la forma de una C, imbrincándose entre ellos mutuamente. Estos dos conjuntos celulares lo forman el asta de Ammon y el giro dentado

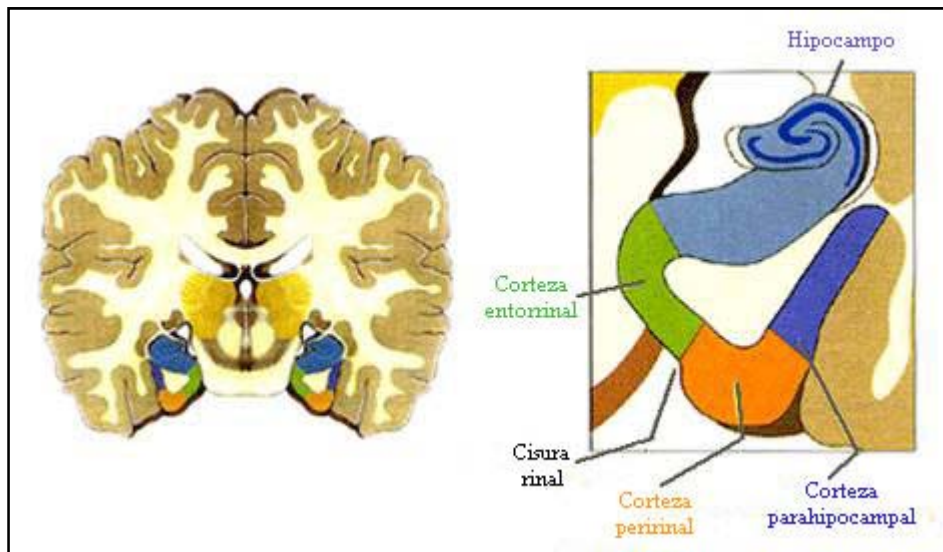


Figura 13.- Representación esquemática de la formación del hipocampo.

A).- Estructura del Asta de Ammon:

Está formada por un alocórtex de dos capas: piramidal y polimorfa, encuadradas en dos capas de sustancia blanca. Siguiendo las descripciones de Cajal distinguimos a partir de la cara ventricular las siguientes capas:

1.- Capa endimaria

2.- Capa plexiforme, en la que distinguimos dos estratos:

a) El alveus: Constituido por fibras mielinizadas de de diámetros variables.

b) El estrato oriens: Se corresponde a la capa de células polimórficas. En esta lámina se hallan los segmentos iniciales de los axones de las células piramidales, El inicio de las colaterales de Schaffer, las dendritas basilares, las fibras aferentes que provienen de la fimbria y del área entorrinal, las terminaciones de las fibras comisurales , las células en cesto descubiertas por Schaffer, e interneuronas de varios tipos.

3.- Capa piramidal: Capa muy densa formada por las gruesas células piramidales, de cuerpo triangular y de talla media (20 – 40 micras). El axón mielinizado de estas células, a poca

distancia de su origen da numerosas colaterales, en particular las colaterales de Schaffer, y constituye la vía eferente del hipocampo.

4.- Capa molecular: rica en fibras y pobre en células. Distinguiamos en ella cuatro estratos:

a) El estrato lucidum: Presente únicamente en algunas zonas del hipocampo. A esta zona llegan las fibras musgosas de las células granulosas del gyrus dentado.

b) El estratum radiatum, constituido por las dendritas apicales de las células piramidales

c) El estratum lacunosum, contiene fibras nerviosas horizontales, que son prolongaciones de las colaterales de Schaffer y ramificaciones de las dendritas apicales de las células piramidales.

d) El estratum moleculare, contiene fibras nerviosas horizontales.

Desde las descripciones clásicas de Cajal, Rose y Llorente de Nó, se distinguen sobre un corte transversal del hipocampo un número de sectores o de campos (tres para Cajal, cuatro para Llorente de Nó y cinco para Rose). Siguiendo la descripción de Llorente de Nó distinguimos cuatro campos: CA1, CA2, CA3 y CA4, que se diferencian los unos de los otros por particularidades citológicas de sus células piramidales, sus dimensiones medias crecen de CA1 a CA3, y solamente las células situadas en CA3 y CA4 dan colaterales de Schaffer. (Llorente de Nó, 1934; Cajal, S.R. 1911; Rose, M. 1926). Esta división en campos, se ha demostrado que no solamente es debida a características morfológicas, sino que también aspectos funcionales diferencian a unos campos de otros. Así las células del campo CA1 son más sensibles a la muerte neuronal, debido al alto contenido de receptores NMDA, que permiten la entrada masiva de calcio en las células piramidales en presencia de glutamato, ya que no tienen proteínas quelantes del calcio intracitoplasmático (parvalbumina, calretinina, calbidina). El campo CA3 es algo menos sensible a la muerte neuronal, y el CA2 es el más resistente.

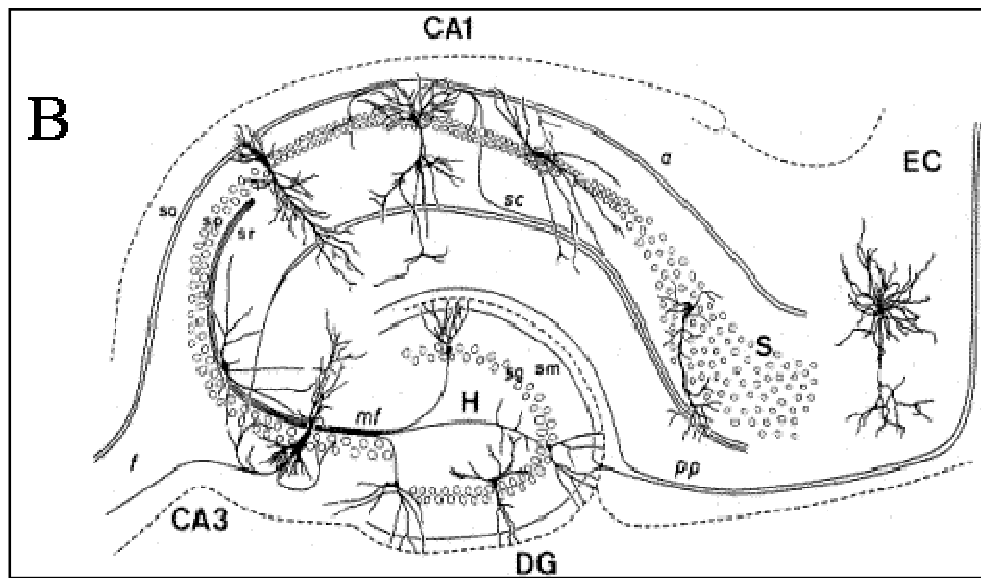


Figura 14.-Esquema del tamaño y forma de las células granulares del DG y de las células piramidales en CA3 y CA1 (Amaral, D.G. y Witter, M.P., 1994).

B).- Estructura del Giro Dentado:

Está compuesto por tres capas:

1.- Capa molecular. Contiene sobre todo arborizaciones dendríticas de las células granulares. Parece en continuidad con la capa molecular de asta de Ammon.

2.- Capa granular: formada por una capa de células pequeñas (14 – 18 micras), situada entre dos capas de fibras plexiformes. Los axones de las células granulosas forman las fibras musgosas que se dirigen al estrato lúcido de los campos CA3 y CA4 del asta de Ammon (Figura 14).

3.- Capa polimorfa formada por células heterogéneas

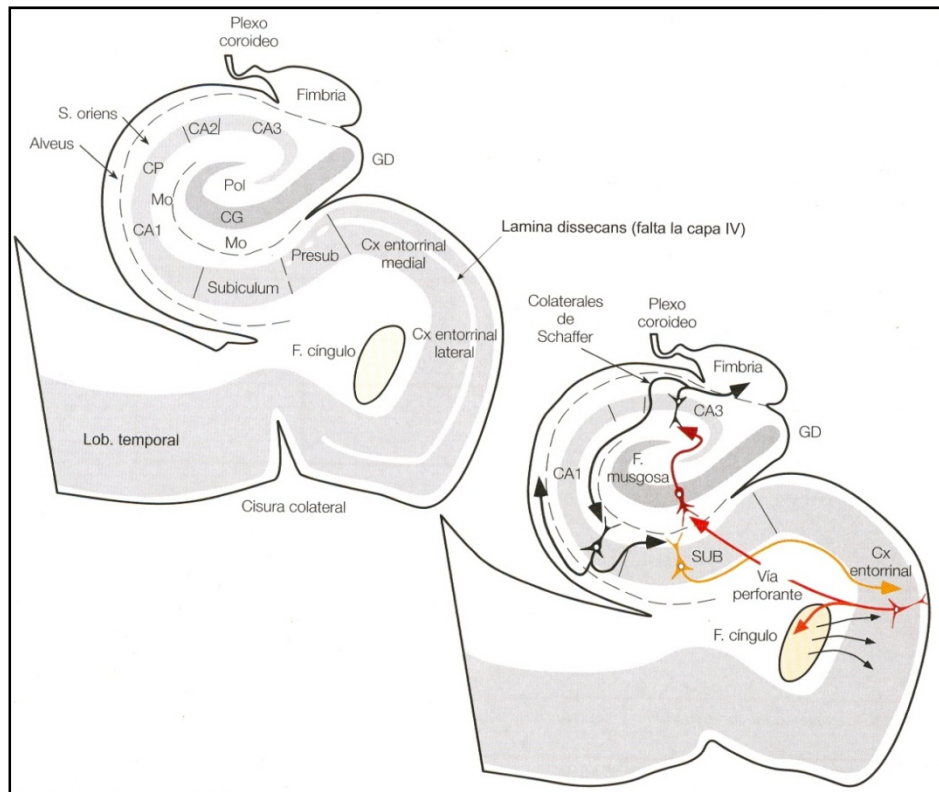


Figura 15.-Subáreas de la corteza hipocámpica en un corte coronal y conexiones intrahipocámpicas (Puelles López, 2008).

1.7.3.1.-Conexiones del hipocampo

1.- Conexiones aferentes:

a- De origen entorrinal

b- De origen septal, que provienen a través de la fimbria

c – Otras aferencias: vías sensitivo sensoriales, olfativas, pre-opticohipotalámicas. Por su latencia no alcanzan directamente el hipocampo, sino que lo hacen a través del área entorrinal.

2.- Conexiones eferentes, a través de la fimbria:

a – Contingente pre-conmisural: Proyecta fundamentalmente sobre el hipotálamo y sobre el septum.

b – Contingente post-commisural: Es mas complejo y proyecta sobre los tubérculos mamilares, tálamo y formación reticular mesencefálica.

3.- Conexiones intrahipocámpicas (Figura 15):

a – Cortas:

Constituidas por abundantes fibras asociativas muy cortas difíciles de sistematizar.

b – Largas

La vía perforante se origina en la capa II del córtex entorrinal que envía sus axones a la sustancia blanca subyacente. Desde allí las fibras atraviesan hacia la capa molecular de las formaciones subiculares, y ya superficiales proyectan sobre la capa molecular del giro dentado, sobre la capa molecular de CA3, de CA2, de CA1 y del subículo.

Las fibras musgosas, constituidas por los axones de los granos, conectan con las dendritas apicales de las pirámides de CA3

Colaterales de Schaffer , que son las colaterales de los axones de las células piramidales, dan colaterales sobre las interneuronas locales y a las dendritas basales de las pirámides cercanas. También los axones de las células piramidales de CA3 envían colaterales a las dendritas de las pirámides de CA1 (colaterales de Schaffer). Los axones de las célulaspiramidales de CA1 envian colaterales al subiculo y al cortex entorrinal.

4.- Conexiones conmisurales:

Los axones de las células piramidales del asta de Ammon forman el Psalterium o Lira de David, que permite la conexión entre ambos hipocampos.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

II.1 JUSTIFICACIÓN

Aunque la aplicación de las radiaciones no ionizantes y su interacción con los seres vivos ocurre desde hace años, no es hasta el desarrollo tecnológico de los últimos tiempos cuando se remarca la importancia del estudio de las radiaciones no ionizantes, y en concreto de su interacción con los seres vivos. Hasta el momento los efectos biológicos de este tipo de radiación se han relacionado con el aumento de temperatura de los tejidos. Sin embargo, se observó la existencia de ciertos efectos que no eran explicados por la hipertermia. Esta hipótesis abrió un nuevo camino en el estudio de las radiaciones no ionizantes. Su comprensión es importante dado que cada vez el tiempo y la frecuencia de las exposiciones a radiación no ionizante se incrementa, pudiendo llegar a constituir un riesgo potencial para la salud.

En el ámbito de la medicina, la aplicación terapéutica de radiación no ionizante de tipo microonda es un tratamiento que se realiza de forma rutinaria en los servicios de Rehabilitación y Medicina física. Aunque se han realizado diversos estudios observacionales en sujetos expuestos a radiación microonda de tipo terapéutico, existen escasos estudios experimentales realizados con radiación microonda a la frecuencia utilizada en esta Tesis Doctoral. Por todo ello, consideramos necesario profundizar en los mecanismos biológicos que derivan de dicha interacción y determinar la posible repercusión clínica que éste pueda tener.

En esta Tesis Doctoral realizamos un estudio experimental en animales de laboratorio expuestos a radiación microonda a una frecuencia de aplicación estándar en terapéutica médica aplicada en Rehabilitación (2,45 GHz). El estudio se lleva a cabo en tejido nervioso dada su mayor sensibilidad a la exposición a radiación y ello nos permite además profundizar en el estudio del comportamiento de las diversas áreas encefálicas y en los mecanismos de estrés celular.

II.2 OBJETIVOS

Los objetivos que nos propusimos en esta Tesis son los siguientes:

1.-Estudiar los efectos biológicos de la aplicación de radiación microonda utilizando un sistema de radiación que nos permita controlar de forma precisa la exposición de animales de experimentación a frecuencias de 2,45 GHz utilizada en terapia física.

Hasta el momento no existe una clara determinación sobre los efectos biológicos de la interacción de la radiación no ionizante con los tejidos biológicos. Los estudios experimentales, aunque abundantes, son muy heterogéneos en cuanto a sus parámetros (frecuencia, tiempo de exposición, intensidades, etc) y ello dificulta comparar estudios experimentales y obtener conclusiones. Nuestra tesis se dirige a detectar efectos a nivel encefálico tras la exposición a esta frecuencia y potencias de microondas usadas en diatermia.

2.-Valorar el efecto de la radiación aguda en el tejido cerebral teniendo en cuenta distintos parámetros electromagnéticos como la intensidad o el tiempo de exposición.

Se han escogido tiempos de exposición entre 15 y 30 minutos que se utilizan habitualmente en terapéutica. Se han estudiado además a nivel neurológico los cambios acaecidos a distintos niveles de evolución temporal postradiación entre 90m y 24 horas para determinar el grado de recuperación o los cambios acaecidos en estos periodos.

3.-Profundizar en los mecanismos de respuesta al estrés cerebral teniendo en cuenta los efectos localizados en distintas regiones o áreas anatómicas.

Los estudios de los efectos de la radiación no ionizante en la anatomía del cerebro son muy escasos y la mayoría de las veces no hacen diferenciaciones en la topografía o tipología celular. Al estudiar algunas de las áreas encefálicas que se muestran más sensibles a la exposición de la radiación de la microonda podemos valorar el grado de implicación regional y celular que se relacionan con mecanismos de regulación al estrés.

4.- La determinación de posibles marcadores biológicos de daño celular, tras la exposición aguda a la radiación no ionizante.

La utilización de las proteínas del choque térmico como marcadores biológicos de daño celular es muy utilizada en procesos patológicos o de toxicología. En nuestra tesis se utiliza como biomarcador la expresión de una proteína constitucional, HSP90, en el tejido cerebral que determinará distintos niveles de estrés o daño celular como un parámetro biológico.

El grado de activación neuronal por la expresión de c-fos en áreas anatómicas como el núcleo paraventricular es un índice importante de la respuesta a estímulos estresantes como la microonda.

5.-Estudiar los efectos a nivel del sistema nervioso central de la aplicación repetitiva de radiación microonda.

Dado que la exposición a la radiación de la microonda no es un proceso aislado sino que ocurre de forma repetitiva, tradicionalmente se considera que su efecto es no acumulativo y que recientemente ciertos estudios contrastan estas hipótesis, hemos querido estudiar los efectos biológicos que pueden derivar de la exposición repetitiva a dicha radiación mediante la expresión del gen c-fos, marcador de activación neuronal, en áreas anatómicas sensibles (en este caso el núcleo paraventricular del hipotálamo).

6.- El cálculo de la Tasa de energía absorbida (SAR) a la que se exponen los animales.

La determinación de los valores de SAR térmico/no térmico es imprescindible para la interpretación y la valoración de los efectos biológicos, ya que nos da un índice biológico de la interacción de la radiación no ionizante con el tejido estudiado, lo que nos permite la cuantificación de la energía absorbida en W/Kg.

La determinación de este índice se llevó a cabo con dos métodos diferentes:

- a) Una combinación de metodología experimental con cálculo FDTD.

- b) La medición de temperaturas rectales con sonda termométrica, que al mismo tiempo nos permitirá cuantificar niveles de estrés.

Esta información nos cuantificará el grado de estímulo que estamos aplicando a los animales de experimentación

III.MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 ANIMALES

En la elaboración de esta tesis se emplearon un total de **148** ratas adultas hembras Sprague –Dawley de un peso aproximado 240 gr.

Todo el experimento con los animales se llevó a cabo de acuerdo a la normativa de la Comunidad Económica Europea de noviembre de 1986 (86/609/EEC) publicado en “Principales cuidados de los animales de laboratorio” (Publicación NIH No. 85-23, revisada en 1985) así como las leyes nacionales españolas (Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio). Los permisos los obtuvimos del comité local de nuestra universidad (USC)

Los animales (4-5 por caja) se mantienen en condiciones ambientales (a temperatura $21\pm 1^\circ$, permaneciendo 12 hs en ciclos de luz). A la alimentación y el agua los animales acceden libremente en cada caja.

III.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

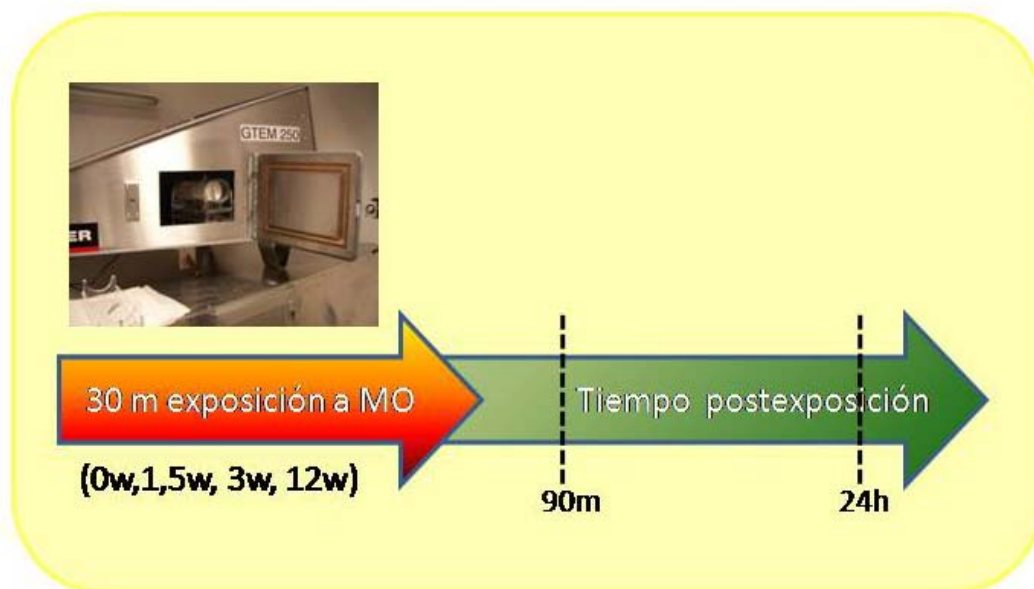
- EXPERIMENTO 1: Estudio de la expresión de HSP90 α/β en el cerebro de ratas expuestas a radiación microonda a 2,45 GHz.

El objetivo de éste estudio es determinar la variabilidad de la respuesta de la proteína HSP-90 como marcador biológico en el cerebro así como las diferencias de vulnerabilidad regional del efecto citoprotector de la chaperona ante la exposición de la radiación no-ionizante. Este estudio se realizó teniendo en cuenta la tasa de absorción específica (SAR) en el tejido nervioso mediante el cálculo FDTD.

Se utilizaron un total de 72 ratas hembra Sprague-Dawley repartidos por tratamientos en los siguientes grupos (Esquema 1; Tabla 8):

Grupo 1: Ratas expuestas a la radiación de microondas durante 30 minutos (colocadas en un cepo de metacrilato) y perfundidas con fijador 90 minutos después de la radiación. Estos animales se subdividieron en 4 subgrupos, expuestos a diferentes niveles de radiación 0, 1,5, 3 y 12 W (el primer grupo no fue irradiado y es el grupo control).

Grupo 2: Ratas expuestas a la radiación de microondas también fueron subdivididas en 4 subgrupos, que fueron expuestas a diferentes niveles de radiación de microondas: 0, 1,5, 3, y 12W de potencia (el primer grupo no irradiado, es el grupo control) durante 30 minutos. Las ratas se mantuvieron vivas 24 hs después de la radiación y posteriormente fueron sacrificadas y perfundidas con fijador.



Esquema 1. Representación esquemática del proceso experimental 1.

Grupos Experimentales	POTENCIA / TIEMPO POSTRADIACIÓN			
Grupo 1	0 W/90 m	1,5 W/90 m	3 W/90 m	12 W/90 m
Grupo 2	0 W/24 hs	1,5 W/24 hs	3 W/24 hs	12 W/24 hs

Tabla 8.-Distribución de los grupos en relación a la radiación y al tiempo de exposición.

- EXPERIMENTO 2: Efecto de la radiofrecuencia a 2,45GHz en la expresión de c-Fos en el núcleo Paraventricular del Hipotálamo de la rata.

El objetivo de éste experimento es estudiar la respuesta de distintas poblaciones del núcleo paraventricular del hipotálamo anterior al aplicar un estímulo físico, la radiofrecuencia de 2.45 GHz en una cámara GETM en la cabeza y cuerpo de ratas utilizando distintos niveles de potencia. El grado de activación neuronal, determinado por la expresión de la proteína del gen c-fos, nos ha dado información de la sensibilidad al efecto de la radiación no-ionizante. Se ha realizado también el cálculo de la tasa de absorción específica (SAR) y la determinación de los niveles de estrés alcanzados por el animal mediante la medición de las temperaturas rectales.

Grupo 1: Ratas expuestas a la radiación de microondas durante 30 minutos (colocadas en un cepo de metacrilato) y perfundidas 90 minutos después de la radiación.

Grupo 2: Ratas expuestas a la radiación de microondas durante 30 minutos y perfundidas 24 hs después de la radiación.

Los grupos 1 y 2 se subdividieron en 2 grupos de animales que fueron expuestos a potencias crecientes de 3 y 12 W. Parte de estos animales se utilizaron para la medición de temperaturas rectales para realizar el cálculo de SAR y de niveles de estrés después de la radiación (Esquema

2)

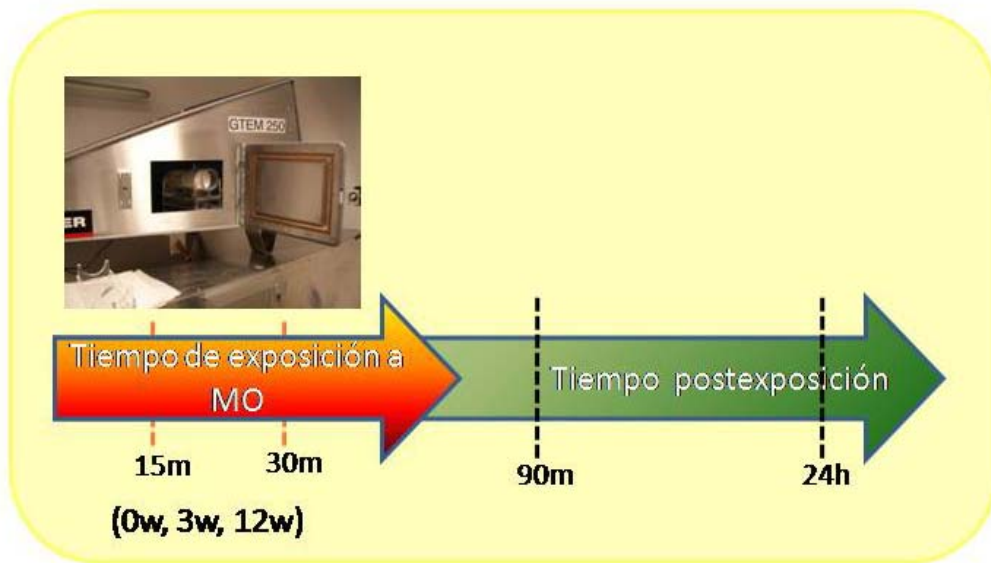
Grupo 3: Ratas expuestas a la radiación de microondas durante 15 minutos y perfundidas 90 minutos después de la radiación.

Grupo 4: Ratas expuestas a la radiación microonda durante 15 minutos y perfundidas 24 horas después de la radiación.

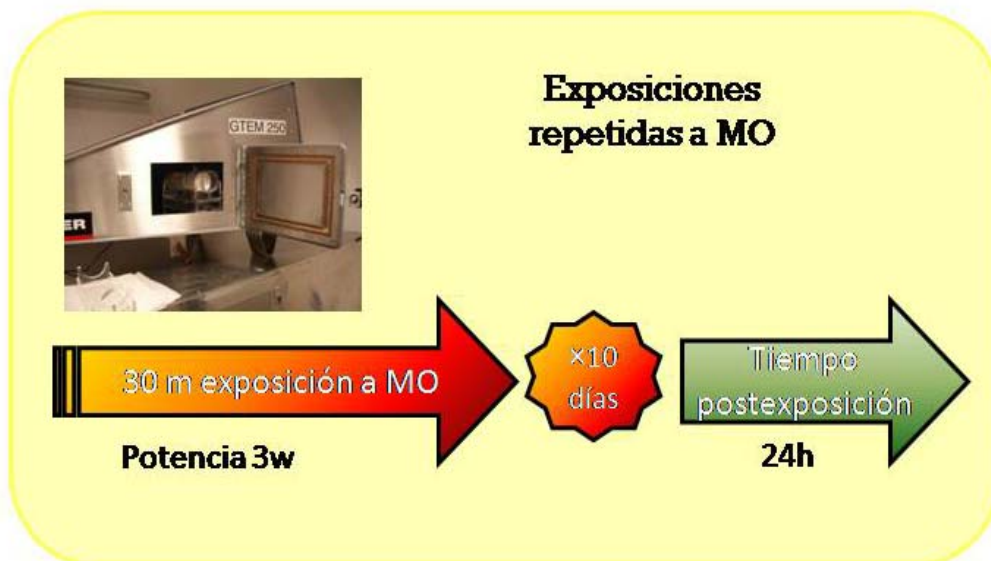
Los grupos 3 y 4 se subdividieron en 2 grupos de animales que fueron expuestos a potencias crecientes de 3 y 12 w. Parte de estos animales se utilizaron para la medición de temperaturas rectales para realizar el cálculo de SAR y de niveles de estrés después de la radiación (Esquema 2)

Grupo 5: Ratas expuestas de forma repetida a radiación microonda a potencia de 3w durante 30 minutos (10 días), y perfundidas 24 h después (Esquema 3).

Grupo 6: Animales control, no se les sometió a ningún tipo de radiación con microondas pero permanecieron en el cepo el mismo tiempo que los animales a los que se expuso a la radiación en la cámara, repetidas veces, como el grupo 5. Posteriormente los animales fueron perfundidos a los mismos tiempos que los animales expuestos.



Esquema 2.- Representación esquemática del proceso experimental 2, grupos de exposiciones agudas a microonda.



Esquema 3.- Representación esquemática de la fase de exposiciones repetidas a microonda (MO) del proceso experimental 2.

III.3. RADIACIÓN CON MICROONDAS EN CAVIDAD EXPERIMENTAL (GTEM). CÁLCULO DEL SAR

III.3.1. Descripción del sistema experimental de radiación

Una vez introducidos los animales en un cepo de metacrilato de tamaño, 23 x 6 cm en su parte más ancha y adicionalmente 6 x 1,8 en la parte más estrecha destinada al hocico (para evitar la reflexión de las microondas de la antena receptora), se procedió a la radiación de los animales. El sistema experimental, donde se radiaron los animales, consta de los siguientes elementos:

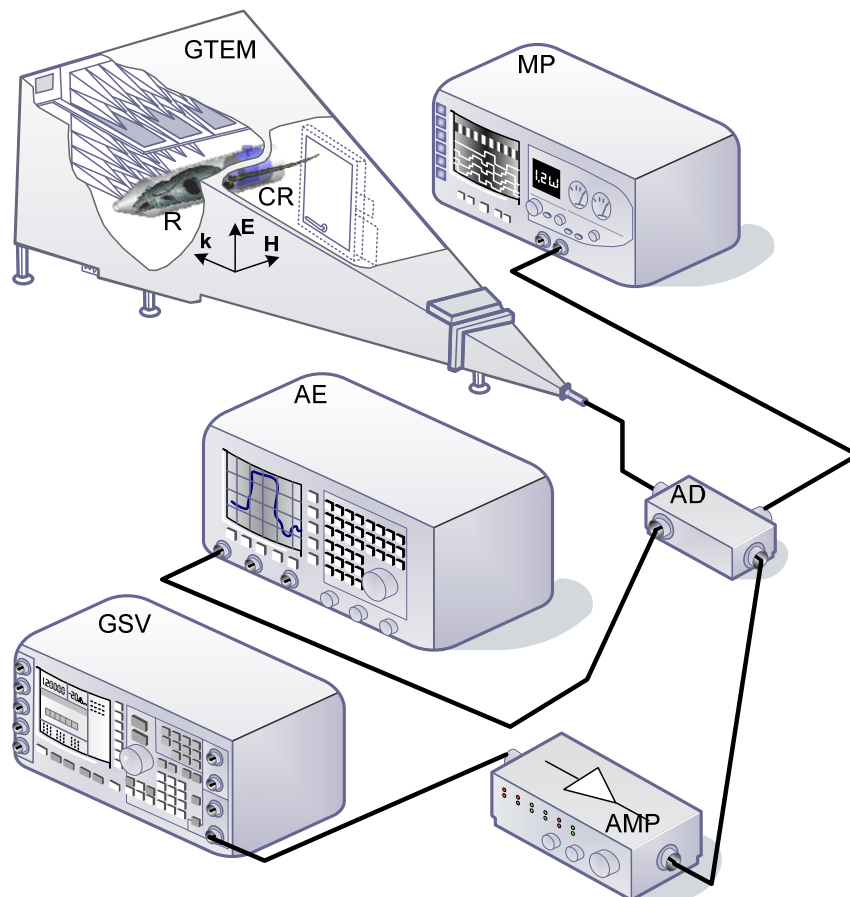


Figura 16: Esquema (no a escala) del sistema utilizado. GTEM: Cámara GTEM Schaffner 250; GSV: Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4GHz); AMP: Amplificador Aethercomm 0.8-3.2-10; AD: Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz); AE: Analizador de Espectro Agilent E4407B (9KHz-26,5GHz); MP: Medidor de Potencia Agilent E4418B; CR: Cápsula Contenedora de la Rata Bajo Prueba.

Elementos que constituyen el sistema de radiación:

- 1- Cámara GTEM Schaffner 250
- 2- Generador Vectorial de Señales
- 3- Amplificador
- 4- Acoplador Direccional
- 5- Analizador de espectro
- 6- Medidor de Potencia
- 7- Capsula contenedora dela rata

La cavidad metálica de radiación de dimensiones 6,95x3,58 x2,55cm/1,00x1,30cm/1,10x1,10x1,10cm/0,85x0,85x0,45c. La señal del Generador de Señales Vectorial (GSV) alimenta al amplificador AMP con una señal sinusoidal pura de 4550 MHz regulada a la potencia requerida durante la irradiación. La salida procedente del AMP se conecta al Acoplador Direccional (AD) para pasar directamente a la Cámara de Radiación GTEM en donde se encuentra la rata R irradiada, convenientemente posicionada en la zona de máxima uniformidad de campo (catálogo de Schaffner) e inmovilizada mediante un cepo de metacrilato (CR). El AD permite medir los valores de potencia incidente P_{IN} y reflejada P_{REF} , monitorizando el valor de la primera, mediante el Analizador de Espectros (AE) y obteniendo el valor de la segunda con el Medidor de Potencia (MP).

Se observa que e campo incide sobre R en la dirección \mathbf{k} con los vectores \mathbf{E} y \mathbf{H} posicionados perpendicular y paralelamente al eje principal de \mathbf{R} , respectivamente. Consecuentemente, a la zona izquierda de R recibe la máxima amplitud de campo, produciendo apantallamiento en la zona derecha. Puesto que el campo no es completamente uniforme en dicha región, su módulo se estima por el valor medio incidente sobre R, calculado mediante la expresión:

$$E = \sqrt{Z_0 P_{IN} / (h^2 \zeta)}$$

siendo h la altura de la bóveda (*septum*) en la zona de exposición (posición de la CR), (ver Fig. 1); P_{IN} la potencia de entrada en la GTEM (potencia incidente); $Z_0=50$ [Ω] la impedancia de

entrada de la GTEM, y ζ un coeficiente que depende del Rizado del campo dentro de la zona de posicionamiento de CR¹, considerado igual a 2 [catálogo de Schaffner]. El valor de E obtenido durante la experimentación de acuerdo a la P_{IN} utilizada se presenta en la sección correspondiente a los resultados.

III.3.2. Descripción de las simulaciones y cálculo del SAR mediante el SEMCAD

Los valores de SAR se han estimado con la ayuda del SEMCAD X (Schmid and Partner Engineering, A.G., 2005), un software de simulación basado en el método FDTD, según se ha comentado anteriormente. Para ello, se utilizó un modelo numérico de rata Sprague-Dawley de 198,3 gramos (modelo R8, Schmidt, 2005), ensamblada en cortes de 1, 15 mm (obtenidos con imágenes de resonancia magnética) y compuesta por 60 tejidos diferentes. El modelo numérico fue radiado con una onda plana incidiendo sobre la zona izquierda del animal, siendo el campo magnético \mathbf{H} paralelo a su eje principal (ver Fig.16). El valor de campo E fue especificado por la ecuación (1). Las simulaciones ejecutadas en un PC de escritorio con procesador Intel Core 2 Quad a 2,40 GHz y 4 GB de RAM) se realizaron a 2,45 GHz.

Las estimaciones del SAR fueron obtenidas mediante un factor de corrección aplicado a los valores obtenidos con las simulaciones numéricas, en proporción al peso de la rata numérica respecto de los pesos de los animales utilizados durante la experimentación, es decir:

$$SAR_E = SAR_S \times W_S / W_E \quad (1)$$

donde SAR_E es la estimación del SAR experimental, SAR_S es el valor de SAR obtenido durante la simulación, $W_S=198,3$ [g] es el peso del modelo numérico, y W_E [g] es el peso del animal bajo experimentación.

¹ Este factor también depende de la modulación de la señal, aunque en el presente caso esto no tiene influencia, puesto que la señal es sinusoidal pura.

III.4. ESTUDIO DE LA DETERMINACIÓN TÉRMICA EXPERIMENTAL DURANTE LA RADIACIÓN PARA EL CÁLCULO DEL SAR Y LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÉS.

III. 4.1 *Estimación del valor del SAR mediante medidas de temperatura rectal.*

Se procedió a obtener medidas tanto de temperatura rectal de los animales antes e inmediatamente después de cada exposición a la radiación y para cada animal, utilizando el termómetro digital Temp JKT (Eutech instruments), como de temperatura ambiente dentro de la cámara GTEM con un termómetro convencional de mercurio. Al encontrarse poca variación en estas últimas, se consideró que no influirían en la temperatura de los animales. Los niveles de SAR en el cuerpo fueron estimados a través de la expresión:

$$SAR_{\Delta T} = \frac{P_A}{m} = \frac{Q/\Delta t}{m} = \frac{(C_e m \Delta T)/\Delta t}{m} = \frac{C_e \Delta T}{\Delta t} \quad (1)$$

siendo P_A [W] la potencia absorbida por la rata de masa m [kg], Q [J] la cantidad de calor absorbida por ésta, $C_e=3470$ [J/kg°C] (Refinetti, R., 2003) el calor específico del cuerpo, ΔT la diferencia de temperatura obtenida antes y después de la exposición hecha en el intervalo de tiempo Δt .

III.4.2 *Estimación de los niveles de stress mediante medidas de temperatura rectal.*

En los animales del experimento 2 se realizaron medidas de la temperatura rectal para poder evaluar como afecta la radiación a los ajustes que realiza el hipotálamo en los mecanismos de termorregulación al recibir estos estímulos que pueden ser desencadenantes de estrés. Las mediciones de temperatura se llevaron a cabo con una sonda termométrica Eutech instruments. Se realizaron las siguientes mediciones: antes de introducir al animal en la cámara de radiación, inmediatamente después de realizar la exposición y posteriormente a los 30m, 60m, 90m y 24 horas (momento en que se sacrificaron los animales). El seguimiento de las temperaturas rectales de los animales correspondientes a cada uno de los grupos expuestos o no

expuestos a la radiación nos permitió determinar la evolución temporal de los niveles de stress así como las diferencias del comportamiento entre los animales

III.5. TÉCNICA GENERAL DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

III.5.1. Extracción de tejido.

Se dejaron después de la radiación los tiempos de supervivencia indicados en cada caso en el diseño del experimento, noventa minutos o bien veinticuatro horas después de la exposición. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la extracción del tejido de cerebro tras anestésiar al animal profundamente con éter etílico y proceder al sacrificio de éste posteriormente.

Se extrajo tejido de distintas áreas del cerebro para su valoración y cuantificación por Western Blot (WB). Para ello se separaron distintas regiones del cerebro del animal tras su correcta visualización bajo una lupa Nikon Eclipse CFI60, fueron las siguientes regiones: Región Somatosensorial, Corteza Límbica, Hipocampo e Hipotálamo.

III.5.2. ELISA

Una vez que se ha extraído el tejido conservado a -30°C se realiza la lisis con una proteasa e homogeneizado de la misma. Posteriormente se medirá la concentración de proteína en cada muestra y se realizará la dilución de las mismas con tampón de contacto hasta igualar en las diluciones la concentración de la proteína.

Las distintas muestras a estudiar se colocan en placas de plástico que se meterán en una cámara húmeda durante toda la noche. Al día siguiente se realiza la incubación de las muestras con un suero monoclonal de ratón para HSP-90 (IgG_{2a}) (Santa Cruz Biotechnology) durante una hora a una concentración 1/200. Posteriormente se procede a la incubación durante 1 hora con un antisuero de cabra contra ratón IgG marcado (Santa Cruz

Biotechnology) con HRP a concentración de 1/2000. Finalmente se procederá al revelado con DAB.

III.5.3. Western Blot (WB)

Primeramente se separa la macromolécula de la proteína HSP-90 mediante electroforesis en una matriz o gel. Una vez separada por su peso molecular utilizando la membrana previamente teñida con un marcador de peso molecular de 90K se transfiere a una segunda matriz de PVDF. Posteriormente se realiza el bloqueo con leche a los sitios inespecíficos de unión en la membrana para evitar marcaje inespecífico. Se procederá al lavado con tampón de bloqueo diluido y tritón (al 0,05%). Se procedió posteriormente a la incubación con un antisuero primario de ratón HSP-90 (Santa Cruz Biotechnology) a dilución de 1/100 durante 1 hora y después el mismo tiempo con un antisuero de cabra contra conejo a dilución de 1/1000 marcado con el enzima HRP. (Santa Cruz Biotechnology) Finalmente se procederá al revelado con el substrato DAB dando un marcaje de color marrón (DAKO).

III.6. TÉCNICAS GENERALES DE INMUNOHISTOQUÍMICA

III.6.1. Perfusión y procesamiento de tejido

Después de exponer a los animales en la cámara los 30m de radiación y de esperar para su sacrificio según el grupo a estudiar, se procedió a su traslado al laboratorio de perfusión. Una vez que los animales estuvieron anestesiados profundamente con pentotal (mirar dosis) se perfunden transcárdialmente vía aorta ascendente, primero con salino al 0,9% durante 30 segundos para lavar los vasos y después con paraformaldehído frío al 4% en tampón fosfato 0,1M de pH 7,4. Se extraen los cerebros y subsiguientemente se lavan y crioprotegen con tampón fosfato que contienen un 20% de sacarosa durante toda la noche y finalmente se cortan en secciones de 40 micras en un micrótomo de congelación

III.6.2. Técnicas de tinción de Azul de Toluidina

Los cortes de tejido seriados y montados en portaobjetos se proceden a deshidratar mediante lavados durante 3 minutos en alcoholes de gradación descendente, terminando en agua destilada. Posteriormente se introduce el tejido en cubetas de vidrio que contienen el colorante violeta de azul de toluidina. Se mantiene el tejido en contacto con el colorante entre 2 y 5 minutos. Una vez finalizado el periodo de exposición al colorante se procede a la fase de aclarado y deshidratación. Para el aclarado lavamos en solución tampón de acetato (pH 4,2) durante unos segundos. Inmediatamente después procedemos al proceso de deshidratación. Para ello bañaremos las muestras en sucesivas cubetas con soluciones de alcoholes de gradaciones ascendentes. Por último, realizamos un aclarado en xilol durante un breve periodo de tiempo y posteriormente procedemos a cubrir con el portaobjetos.

III.6.3 Inmunohistoquímica

III.6.3.1. Anticuerpos primarios y secundarios

Los antisueros primarios utilizados en las técnicas de detección inmunohistoquímica en ésta tesis se resumen en la siguiente tabla:

TIPO DE ANTICUERPO Primario	FUENTE	Anticuerpo secundario
HSP-90 alfa/beta	Monoclonal anti-ratón en 610-723 HSp-90 humano	Secundario de caballo
Hsp-90	Policlonal anti- conejo	Secundario de cabra
C-FOS	Policlonal anti- conejo	Secundario de cabra

III.6.3.2. Técnicas generales de inmunohistoquímica simple

Inicialmente se someten a las secciones a un periodo de preincubación de una hora en suero normal de la misma especie del animal de la que obtuvo el secundario (de caballo) diluido al 10% en 0.02 M de KPBS tampón fosfato potásico salino con 0,25 o 0,30% de tritón X-100. Las secciones se incubaron toda la noche (mínimo 16 hs) con el anticuerpo primario (suero policlonal anti-conejo de proteína humana HSP-90) diluido en KPBS con 1% de suero normal y 0,25% y 0,30% de tritón X-100 a una concentración de 1/500. Al día siguiente las secciones se lavaron varias veces para eliminar el antisuero no diluido y se incubaron durante 90m a temperatura ambiente con el consiguiente antisuero secundario biotilnado a una concentración de 1:200. Las secciones marcadas con biotina se lavaron y se incubaron posteriormente otros 30m con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (DAKO), diluido a 1:100 en KPBS conteniendo 0,25% de tritón. Finalmente se realizó el revelado e un 0,04% de peróxido de hidrógeno y 0,5% 3-3'diamino bencidina (DAKO)

III.7. CUANTIFICACIÓN Y ESTADÍSTICA

EN EL EXPERIMENTO I: Los resultados obtenidos en el ensayo ELISA han sido analizados mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Tukey-Kramer para múltiples comparaciones.

El número de células HSP-90 positivas o de núcleos de c-Fos son contadas por investigadores que no conocen las condiciones de la exposición. En cada rata, de los distintos grupos se hacen recuentos de 3 o cuatro secciones de cada área localizadas en las siguientes regiones anatómicas. En el caso de las neuronas HSP-90 positivas las regiones estudiadas fueron: a) En la región cortical: corteza somatosensorial o corteza Parietal y corteza Límbica o

corteza Entorrinal b) En estructuras del hipocampo: Giro Dentado (DG) y CA; y c) núcleos hipotalámicos: Paraventricular (Par), Arcuato (Arc) y núcleo hipotalámico lateral (LH) Las secciones del cerebro se midieron en los siguientes niveles interaurales: 9.2 mm para la corteza parietal; 6.88mm para los núcleos hipotalámicos (Par,Ar,LH), 5.7 mm para las áreas hipocampales (GD and CA1) and 4.2 mm para la corteza entorrinal (Paxinos G and Watson CH,1998)

En cada área las células HSP-90 se contaron en campos de 0.32 x 0.24 mm de aumento 20× en un microscopio a Nikon Eclipse E200 microscopio conectado a un ordenador con software morfométrico (from Kappa, Monrovia, CA, USA).

Los contajes por campo en cada una de las áreas son expresadas como medias para animales individuales o experimentos \pm Error estándar de la media por grupo. Las diferencias significativas entre los grupos de los recuentos para células positivas para HSP-90 son llevados a cabo por un ANOVA de dos vías considerando por separado cada una de las áreas teniendo en cuenta el factor potencia de radiación (0, 1,5, 3,12 w) x tiempo postradiación (90m o 24hs).

EN EL EXPERIMENTO II: Se llevó a cabo el recuento de los núcleos de la expresión de la proteína c-Fos en el núcleo paraventricular (Pa) del hipotálamo. En dicho núcleo se realizaron recuentos en las regiones a) Magnocelular (PaLM) y b) Parvocelular (PaMP) c) Ventricular (PaV).

En cada área las neuronas positivas para c-Fos se hicieron recuentos de aumento 40× en un microscopio a Nikon Eclipse E200 microscopio conectado a un ordenador con software morfométrico.

Los contajes por campo en cada una de las áreas son expresados como medias para animales individuales o experimentos \pm Error estándar de la media por grupo. En éste

experimento las diferencias significativas entre los grupos de los recuentos para células positivas para c-Fos se estudiaron mediante 2 ANOVAS distintos: a) En exposiciones únicas, un ANOVA de dos vías considerando por separado cada una de las áreas: teniendo en cuenta 2 factores, el factor potencia de radiación (0, 3, 12 w) x tiempo de exposición (15 ó 30 minutos) b) En exposiciones repetidas, un ANOVA de dos vías considerando por separado cada una de las áreas, el factor radiación (radiado o no radiado) x número de exposiciones (única o repetida).

Una vez realizado los test ANOVA de dos vías en ambos experimentos, las comparaciones post hoc se realizaron usando el test de Bonferroni. Se consideran diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 EXPERIMENTO I:

***ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE HSP90 α/β EN EL CEREBRO DE RATAS
EXPUESTAS A RADIACION MICROONDA A 2,45 GHZ.***

IV.1.2 INTRODUCCION

En la última década se ha incrementado considerablemente el empleo en la industria y en la medicina de campos electromagnéticos a 2.45 GHz, con las nuevas tecnologías de los teléfonos inalámbricos Bluetooth (Otto M., y col., 2007) o en tratamientos rehabilitadores en diversos tipos de patologías o dolor (Radziewsky, A.A. y cols., 2008). Como consecuencia han aumentado los estudios de contaminación electromagnética a esta frecuencia y se han descrito efectos biológicos tanto de naturaleza térmica (Wang J. y cols., 2006; Tian F., y cols., 2002) como no térmica (Paulraj, R. y cols., 2006; Lee, S. y cols., 2005; Busljeta I., y cols., 2004).

Las proteínas de choque térmico (HSP) son chaperonas utilizadas frecuentemente en estudios toxicológicos como biomarcadores de daño celular (Didelot C. y cols., 2006). La exposición de campos electromagnéticos ha reportado numerosas modificaciones en la expresión de proteínas de choque térmico en estudios in vivo (Hsp) (De Pomerai, B. y cols., 2003; Harvey, C. y col., 1999) o in vitro en líneas celulares (Wang, J. y cols., 2006; Caraglia, M. y cols., 2005). La HSP-90 es la variedad más frecuente de las proteínas del choque térmico (Sreedhae, A.S. y cols., 2004) siendo más elevada en tejidos neurales que no neurales (Loones, M.T. y cols., 2000) y se distribuye en neuronas del sistema límbico, neocortex, estriado o tálamo (Gass, P. y cols., 1994; D'Souza, S.M. y Brown; I.A., 1998). Esta proteína actúa en la regulación de la actividad de otras proteínas como los receptores de hormonas esteroideas (Scheibel, T. y Buchner, J., 1998), la protein kinasa (Pratt, W.B.; 1997), la calmodulina (Someren J.S. y cols., 1999), la actina (Miyata, Y. y Yahara, Y., 1991), y la tubulina (Garnier, C. y cols., 1998). Estímulos como la isquemia o los corticoides provocan un aumento de

HSP-90 en CA1, CA3 así como en el Giro Dentado y en el núcleo paraventricular del hipotálamo de los roedores (Patchev, V.K. y cols., 1994; Kawagoe, J. y cols., 1993). Otros estímulos de estrés como la fiebre, convulsiones (Callahan, M.K. y cols., 2008; Wong, M.L. y cols., 1992), drogas (anfetamina o LSD) (Adori, C. y cols., 2006) lesiones traumáticas o enfermedades neurodegenerativas (Batulan, Z. y cols., 2006) provocan modificaciones en los niveles basales de HSP-90. El incremento de HSP-90 en subpoblaciones neuronales (Uryu, K. y cols., 2006) o/ y la activación en nuevas poblaciones no neuronales gliales y microgliales (DelloRusso, C. y cols., 2006) indica la participación de mecanismos neuroprotectores mediados por esta proteína (Liu, D.H. y cols., 2007; Ohtsuka, K. y Suzuki, T., 2000) en el stress oxidativo (Jeon, G.S. y cols., 2004) o actividad anti-apoptótica (Chiral, M. y cols., 2004).

La gran diversidad de resultados que muestra la bibliografía en relación a los valores de las proteínas de estrés térmico tras la exposición a campos electromagnéticos sin aparentes modificaciones en unos casos (Huang, T.Q. y cols., 2008; Chauhan, V. y cols., 2006) o contrariamente, en nuestra propia experiencia (Jorge-Mora, M.T y cols., 2006; Misa-Agustiño, M.J. y cols., 2006) y la de otros autores (Sanchez, S., y cols. 2008; Lixa, S. y cols., 2006; Caraglia M. y cols., 2005) donde se han encontrado importantes cambios en diversas poblaciones celulares de las HSPs in vivo o in vitro ha determinado el presente estudio. Hemos centrado este estudio experimental en el cerebro de animales sometidos a la exposición de campos electromagnéticos in vivo, donde la actividad metabólica es más importante que en otros tejidos y el efecto de la radiación puede ser mayor (Li, M., y cols., 2008). Para ello hemos estudiado la respuesta cuantitativa y cualitativa de la expresión de la proteína HSP-90 en distintas regiones anatómicas del cerebro de los roedores después de la radiación aguda continua y controlada en una

cámara experimental GTEM de ratas Sprague-Dawley in vivo con frecuencias de 2450 MHz y niveles crecientes de exposición de SAR. El objetivo de este estudio es determinar la variabilidad de la respuesta de la proteína HSP-90 como marcador biológico en el cerebro así como las diferencias de vulnerabilidad regional del efecto citoprotector de la chaperona ante la exposición de la radiación no-ionizante.

IV.1.3. RESULTADOS DE SAR

En la tabla 9 aparecen los valores medios obtenidos del cálculo del SAR en los animales con la frecuencia de 2.45 GHz y empleando distintas potencias crecientes de radiación en la cámara Shaffner GTEM.

<i>MEDICIÓN EXPERIMENTAL DE LA RADIACIÓN</i>					
<i>GRUPO A</i>		<i>GRUPO B</i>		<i>GRUPO C</i>	
P=1,5 W	E= 28.48 V/M	P= 3W	E=40.28V/M	P=12W	E=80.56V/M
Media de SAR en el cerebro	Media de SAR en el cuerpo	Media de SAR en el cerebro	Media de SAR en el cuerpo	Media de SAR en el cerebro	Media de SAR en el cuerpo
0,033	0.019	0.071	0.041	0,26	0,15

Tabla 9. Muestra los datos del SAR en el cerebro y en el cuerpo de los animales calculados a partir de la potencia (P) y el campo eléctrico (E).

IV.1.4 NIVELES DE HSP-90 DETERMINADOS MEDIANTE ELISA

- GRUPO 1: Noventa minutos después de la radiación, la determinación de la absorbancia de la proteína HSP-90 a nivel de *la corteza somato-sensorial* en animales radiados con potencias de

1,5 y 3W no mostró cambios estadísticamente significativos en relación a los animales no expuestas a radiación alguna. Los valores de proteína en ratas radiadas con potencias máximas (12 W) mostraron diferencias significativas importantes respecto al grupo no radiado ($p < 0.05$) (Figura 17A).

A nivel de **la corteza límbica** tan solo los valores de SAR térmico (12W) determinaron un incremento en los valores de la proteína con diferencias significativas importantes respecto a los animales control ($p < 0.01$); en el resto de niveles de radiación (1,5 y 3W) no aparecen cambios estadísticamente significativos (Figura 17B).

En **el hipocampo** los niveles de de HSP-90 no mostraron en ningún caso diferencias significativas respecto a los animales no radiados (Figura 17C).

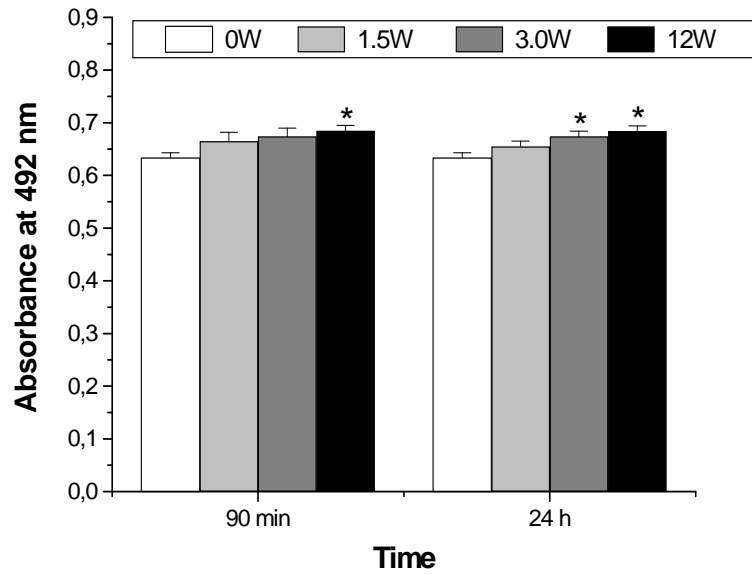
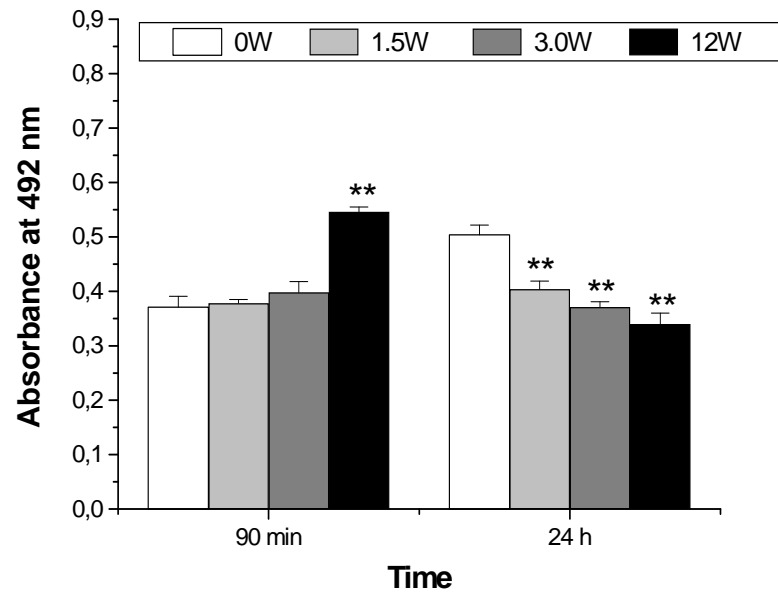
A nivel del **hipotálamo**, noventa minutos después de la radiación experimental, se observó una elevación en los valores alcanzados por la proteína a 1,5 y 3W, que determinaron diferencias significativas importantes respecto a los animales control ($p < 0.05$). Las diferencias significativas alcanzaron su nivel máximo cuando los niveles de exposición se elevan a 12 W de potencia ($p < 0.01$) (Figura 17D)

-GRUPO 2: Los animales perfundidos veinticuatro horas después de la radiación mostraron en **la corteza somatosensorial** diferencias significativas en la cuantificación de HSP-90 en los subgrupos de animales expuestos a potencias de 3 y 12 W con respecto a los animales no radiados 0W ($p < 0.05$) (Figura 17A).

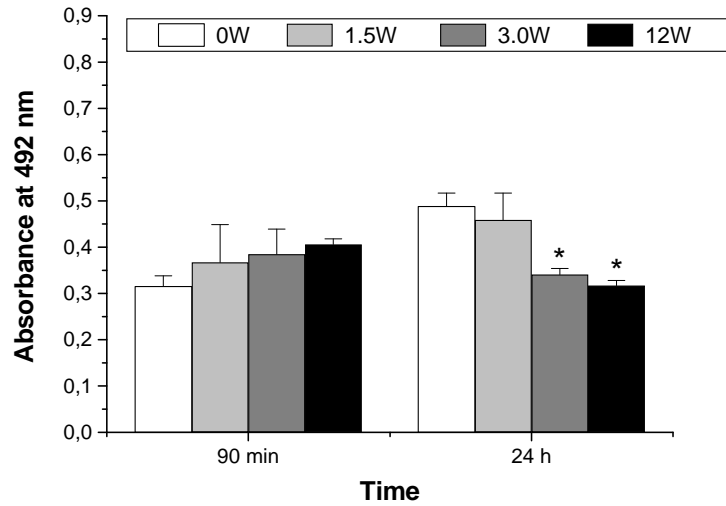
En **la corteza límbica** descienden los niveles de la proteína 24 horas después de la radiación de forma muy significativa para todos los niveles de exposición ($p < 0.01$) (Figura 17B).

Veinticuatro horas después de la radiación se observa un descenso en los valores de HSP-90 en *el Hipocampo* respecto a los animales no radiados tanto a exposiciones de 3 como 12 W ($p < 0.05$) (Figura 1C).

Las diferencias estadísticamente significativas observadas en *el Hipotálamo* inicialmente respecto a los animales no radiados se mantienen 24 horas después de la radiación sólo para 12 W ($p < 0.05$), (Figura 1D)

A) Corteza somatosensorial**B) Corteza límbica****Figura 17**

C) Hipocampo



D) Hipotálamo

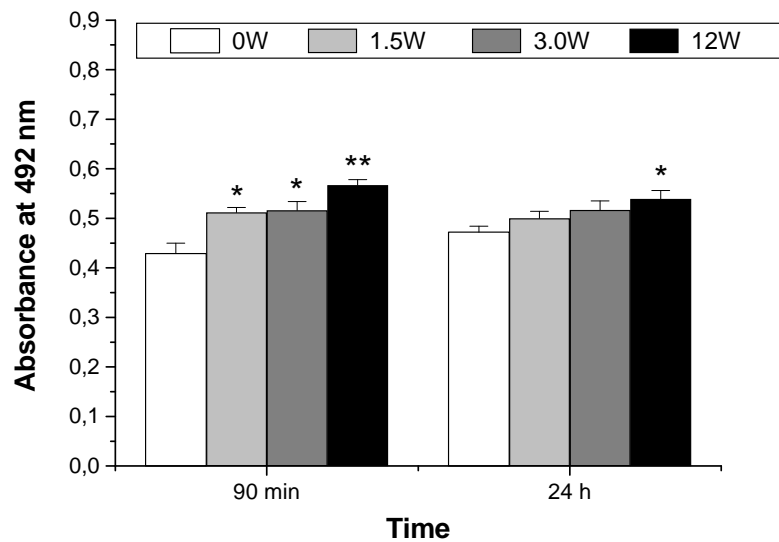


Figura 17

Figura 17.- Los histogramas A y B muestran la densidad de la proteína HSP-90 detectada por ELISA en la corteza cerebral: **A)** A nivel de la corteza somatosensorial, (corteza parietal) **B)** A nivel de la corteza límbica, (corteza entorinal). Los histogramas C y D muestran la densidad de proteína detectada por ELISA en las regiones subcorticales: **C)** A nivel del hipocampo **D)** A nivel del hipotálamo. Expresada como la media \pm E.E.M. mediante un ANOVA de una vía y test un test a posteriori Tukey- Kramer test para comparaciones múltiples.

IV.I.5. DISTRIBUCIÓN DE HSP-90 EN INMUNOHISTOQUÍMICA

La distribución de la expresión de HSP-90 observada en los recuentos de las subpoblaciones celulares noventa minutos después de la radiación mostraron modificaciones en los animales a los que se les somete a niveles máximos (12W) de SAR respecto a los animales control que no han sido expuesto a radiación (0W). En cuanto a los grupos de animales expuestos al resto de SAR no térmico existe variabilidad. Los animales sometidos a estudio 24 hs después de ser radiados presentaron en todos los casos diferencias significativas respecto al grupo 2 ($p < 0.05$) pero una gran variabilidad en los recuentos celulares dependiendo de la región. La distribución, recuento y el análisis estadístico de los valores obtenidos de las distintas poblaciones celulares estudiadas en las diversas áreas anatómicas se describe seguidamente.

1)- A nivel de *la corteza Somatosensorial (corteza parietal)* el factor radiación establece diferencias significativas entre los recuentos celulares de HSP-90 llevados a cabo en la capa 5 (constituida por neuronas piramidales) entre las distintas potencias de radiación ($p < 0.05$) excepto entre las potencias de 1,5 y 3W ($p = 0.443$). Sin embargo el tiempo post-radiación constituye un factor de influencia positiva para establecer diferencias estadísticas entre los grupos ($p < 0.05$) en esta área anatómica.

Excepto en los animales que no han sido sometidos a radiación (0W) los recuentos celulares que aparecen para 1,5, 3 y 12 W alcanzaron incrementos importantes y se establecieron diferencias significativas si comparamos los grupos de animales radiados 90m y 24hs post-radiación ($p < 0.05$).

En esta área de la corteza las diferencias estadísticas en el recuento se establecieron entre todos los grupos de radiación tanto 90m como 24hs después de la radiación excepto para potencias de 3W vs 1,5 ó con 12 W ($p = 0.093$ o $p = 1$ y $p = 0.202$ ó $p = 0.076$) (Figura 18 A y B).

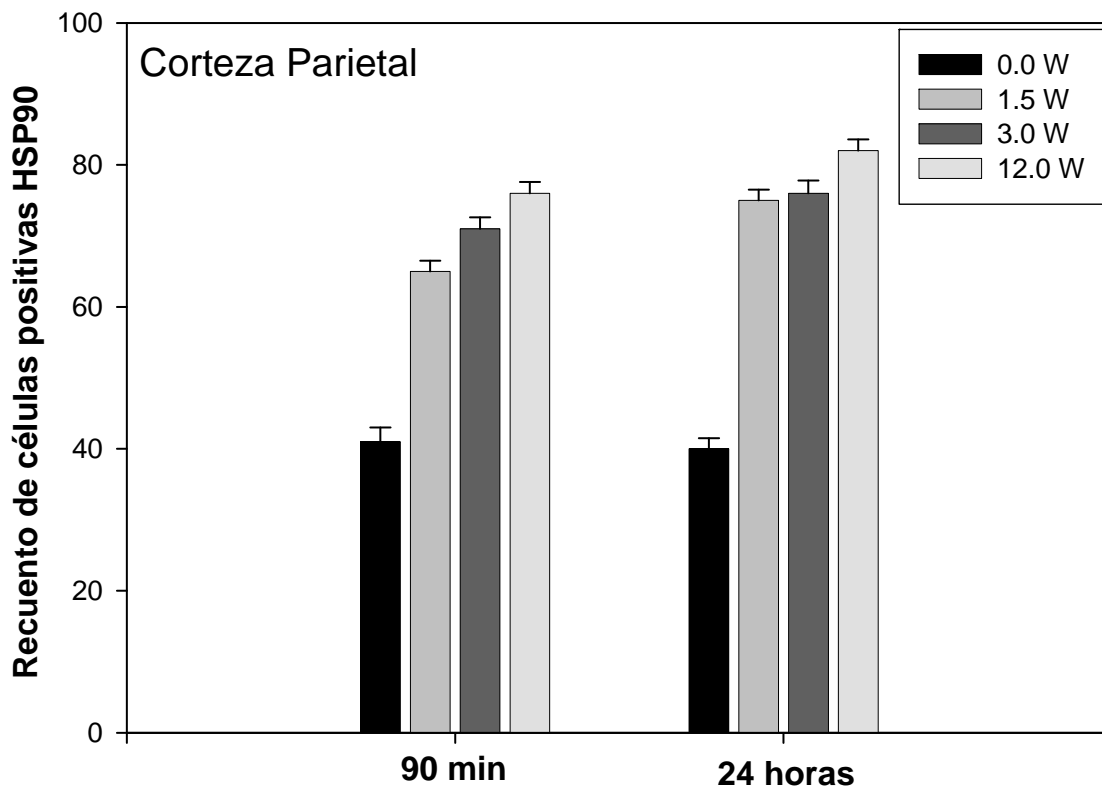


Figura 18 A) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas HSP-90 positivas en la corteza parietal (neuronas/mm², media ± E.E.M) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $p < 0.05$

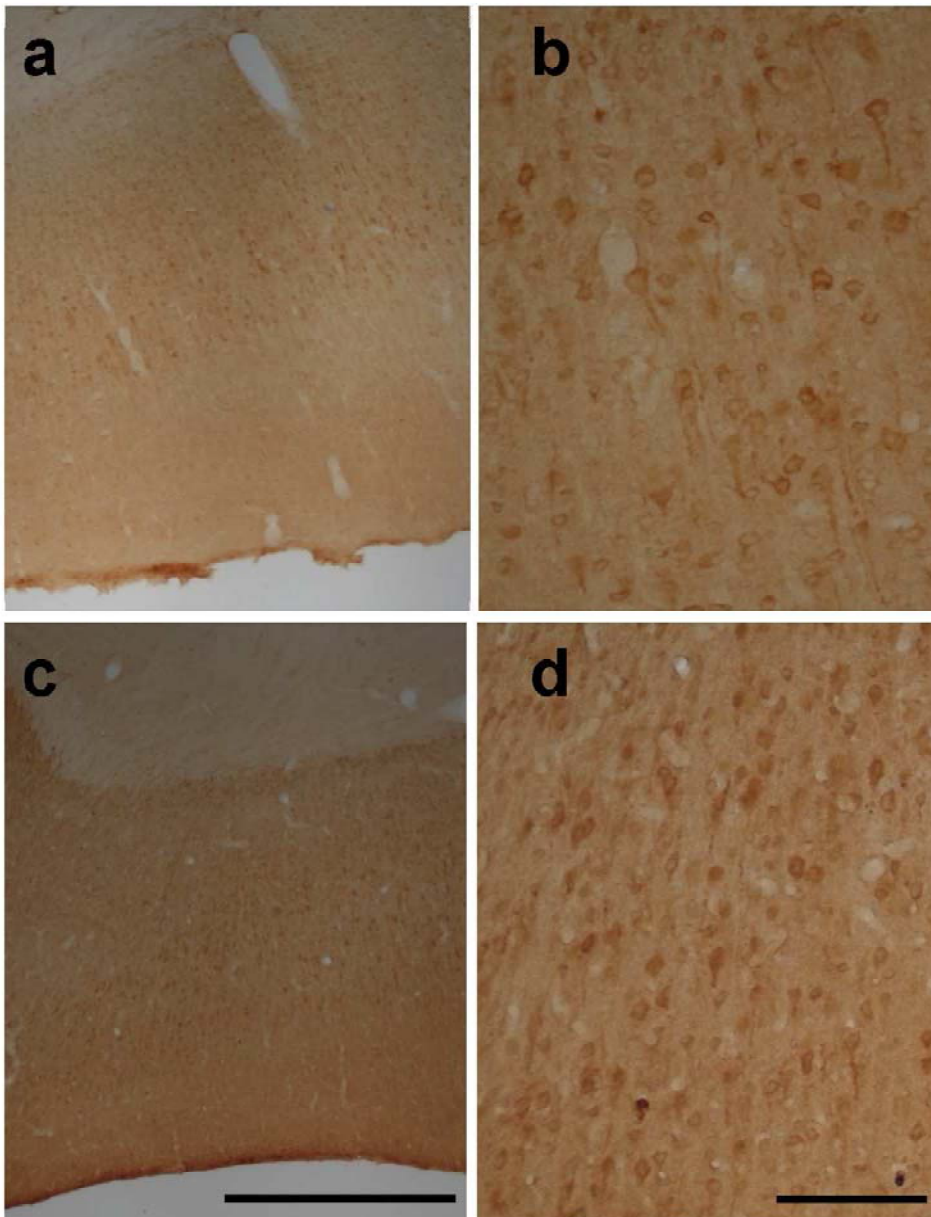


Figura 18B) En la microfotografía se pueden observar el incremento del inmunomarcaje para la proteína HSP-90 entre las neuronas de la corteza parietal de los animales sometidos a potencias de 12 W (**c** y **d**) respecto a los animales control (**a** y **b**) ambos perfundidos 90m post-radiación. Barras de calibración: (**a**, **c**)= 250 μ m (**b**, **d**)= 500 μ m

2).-En *la corteza Límbica (Corteza Entorrinal)* los niveles celulares de HSP-90 presentaron diferencias significativas importantes 90 minutos después de exponer las ratas en la cámara de radiación a los niveles más altos de potencia (12W) si los comparamos con los recuentos de las otras potencias ($p < 0.001$). No hay diferencias significativas en el recuento celular entre los animales no radiados y las potencias de 1,5 y 3 W.

Veinticuatro horas después de la radiación los valores celulares de HSP-90 descendieron solo significativamente en potencias de 12 W ($p < 0.001$). En el resto de las potencias (1.5 y 3W) los niveles celulares no se modificaron respecto a los grupos sacrificados 90 minutos después de la radiación ($p=0.93$ y $p=0.693$). Sin embargo los animales control (no expuestos a radiación) mostraron una elevación significativa de células positivas para HSP-90 ($p < 0.001$). Las diferencias estadísticas significativas entre los distintos niveles de exposición a la radiación siguen siendo muy importantes entre la potencia máxima (12W) y el resto de los grupos ($p < 0.001$ con todos ellos). Además se establecen diferencias significativas entre el grupo control (0W) con 3W ($p < 0.007$) o con 1,5W ($p < 0.011$) (Ver Figuras 19 A y B).

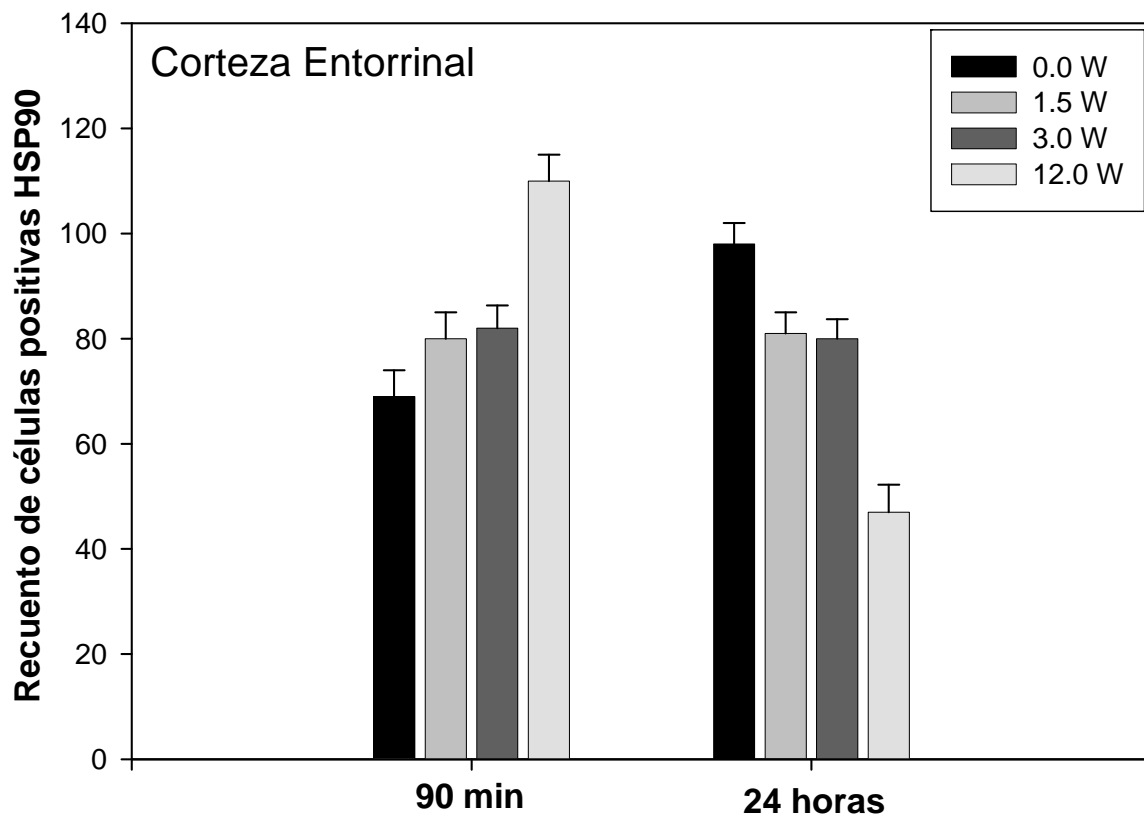


Figura 19 A) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas HSP-90 positivas en la corteza Entorrinal (neuronas/mm², media ± E.M) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $P < 0.05$

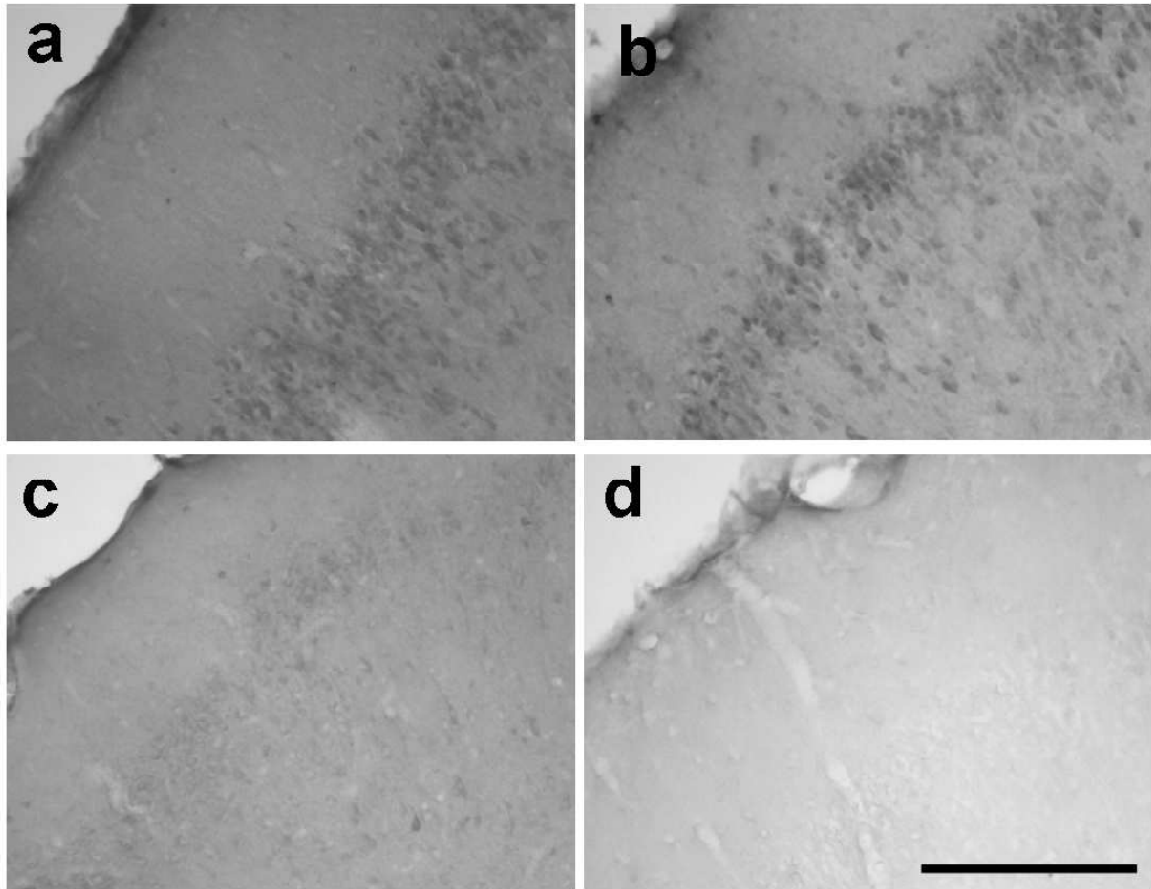
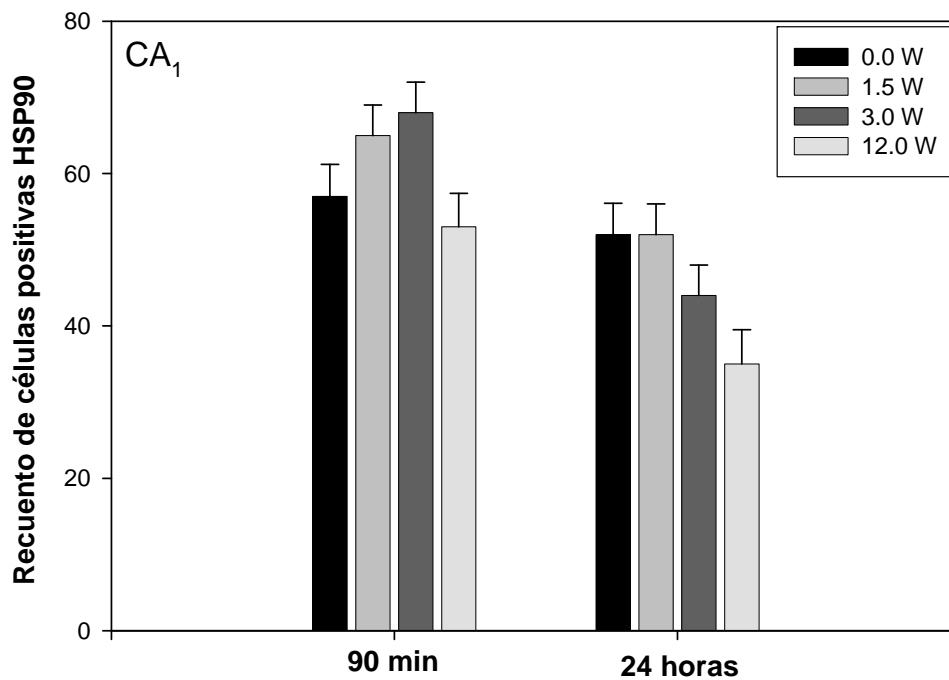
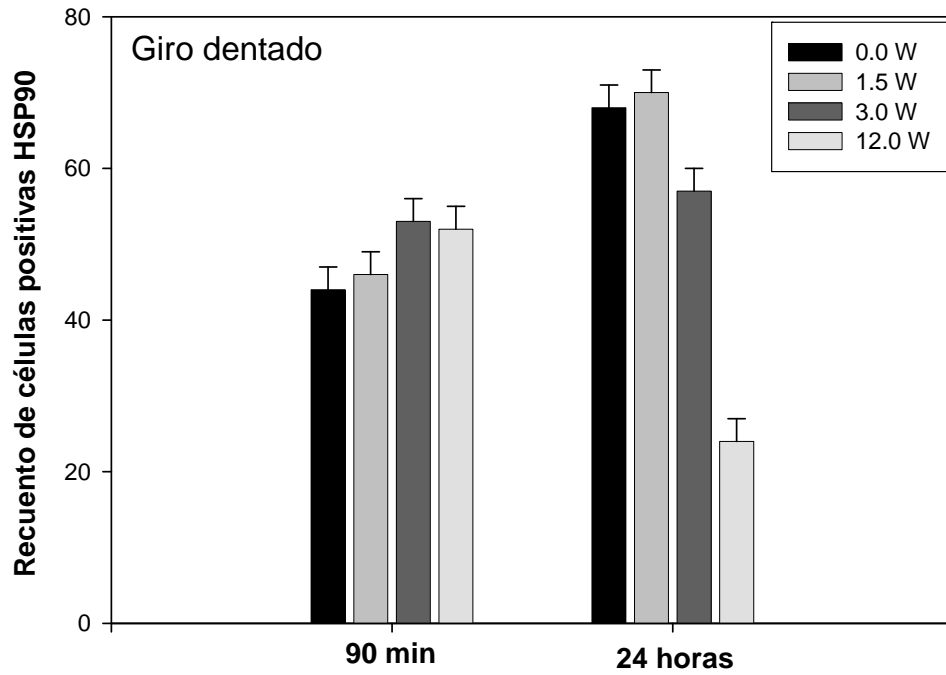


Figura 19B).- En la microfotografía se pueden observar el incremento del inmunomarcaje para la proteína HSP-90 entre la neuronas de la corteza entorinal de los animales sometidos a potencias de 12 W (**b**) respecto a los animales control, ambos perfundidos 90m postradiación (**a**). Sin embargo hay una gran disminución del marcaje 24hs después de la radiación, entre los animales control (**c**) y los animales expuestos a 12 W (**d**). Barra de calibración: 500 μ m.

3).- En la región del **Hipocampo** (en las áreas del GD y en CA1) considerando por separado el factor de la radiación (tanto 90 minutos y 24 horas postradiación) mostraron una influencia importante en potencias máximas respecto a los otros grupos ($p < 0.001$). El tiempo post-radiación establece diferencias significativas importantes en todos los grupos de radiación ($p < 0.05$).

Noventa minutos después de exponer las ratas en la GTEM los efectos de la radiación no establecen diferencias significativas en los recuentos entre los distintos grupos de radiación ni en el GD ni en CA1.

Veinticuatro horas después de la radiación el grupo de 12 W mostró un descenso muy importante en los niveles de recuentos celulares respecto a 90m postradiación. ($p < 0.001$) tanto en el GD como en CA1. Así mismo a nivel del GD, el grupo de animales radiado con potencia máxima (12W) mostró diferencias significativas con los otros tres grupos ($p < 0.001$) y el de 3W con 1,5W y el grupo no sometido a radiación (0W) ($p=0.013$ y $p=0.046$, respectivamente. En CA1, sin embargo no aparecen diferencias significativas entre ninguno de los 4 grupos (ver Figuras 20 A, 20 B y 20 C).



Figuras 20 A) y B) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas HSP-90 positivas en el Hipocampo, **A** Giro dentado y **B** CA₁ (neuronas/mm², media ± E.M) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $P < 0.05$

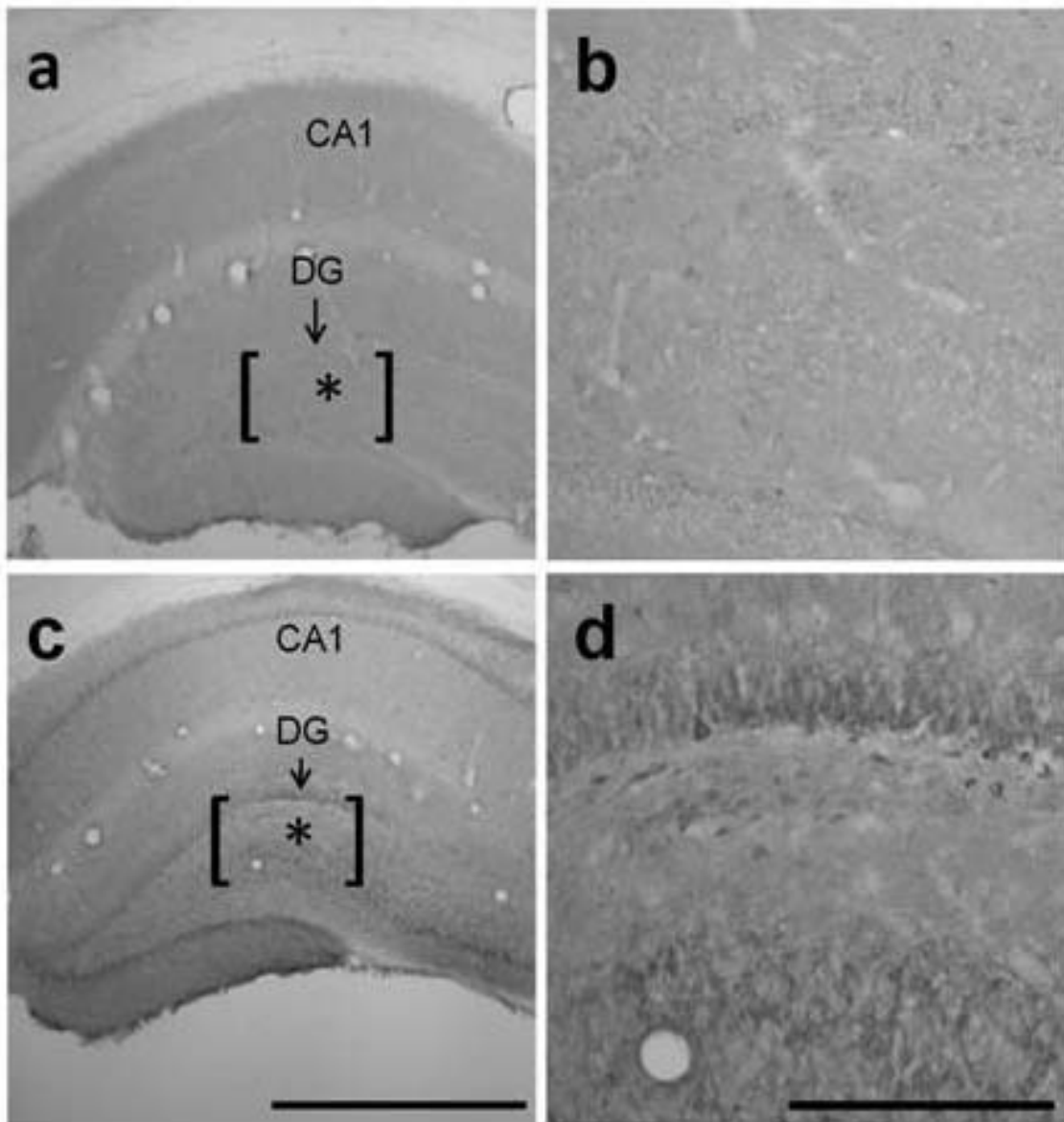


Figura 20 C) En la microfotografía se pueden ver una disminución importante de inmunomarcaje para la proteína HSP-90, en el Giro Dentado (DG) y CA1 (a y c) entre animales en animales expuestos a potencias de 12 w, detalle de GD (b) y control (d) 24 hs después. Barras de calibración: (a, c)= 200 μm (b, d)= 500 μm .

4).- A nivel del **Hipotálamo**, los recuentos celulares llevados a cabo en los 3 núcleos hipotalámicos (**Pa**, **Arc**, **LH**) indicaron un incremento máximo de los niveles celulares cuando a los animales se les expuso a la cámara experimental a los niveles de SAR más elevados, presentando diferencias significativas con los otros 3 grupos de radiación e incrementándose cuando pasa de 90m a 24hs post-radiación ($p < 0.001$). En exposiciones de 3W hay un incremento celular entre 90m y 24 hs post-radiación ($p < 0.001$), estableciéndose diferencias significativas entre esta potencia y ratas no radiadas, 90m y 24hs post-radiación en el núcleo LH ($p < 0.001$) y solo a 90m en el núcleo Arc ($p < 0.001$). Finalmente en exposiciones de 1,5 W las diferencias significativas aparecen en relación a los animales no radiados tanto a 90m como 24 hs post-radiación ($p < 0.001$) en el núcleo LH (ver Figuras 21 A y B; 22 A, B, y C).

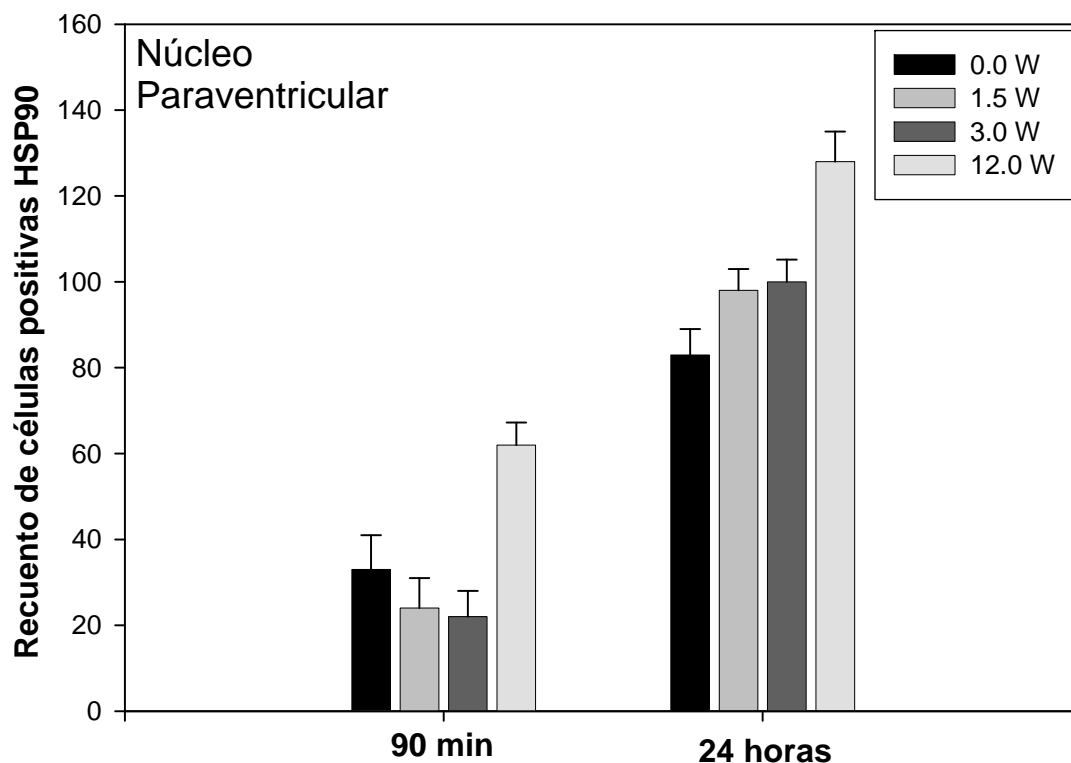


Figura 21 A) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas HSP-90 positivas en el Núcleo Paraventricular (Pa) (neuronas/mm², media ± E.M) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $P < 0.05$

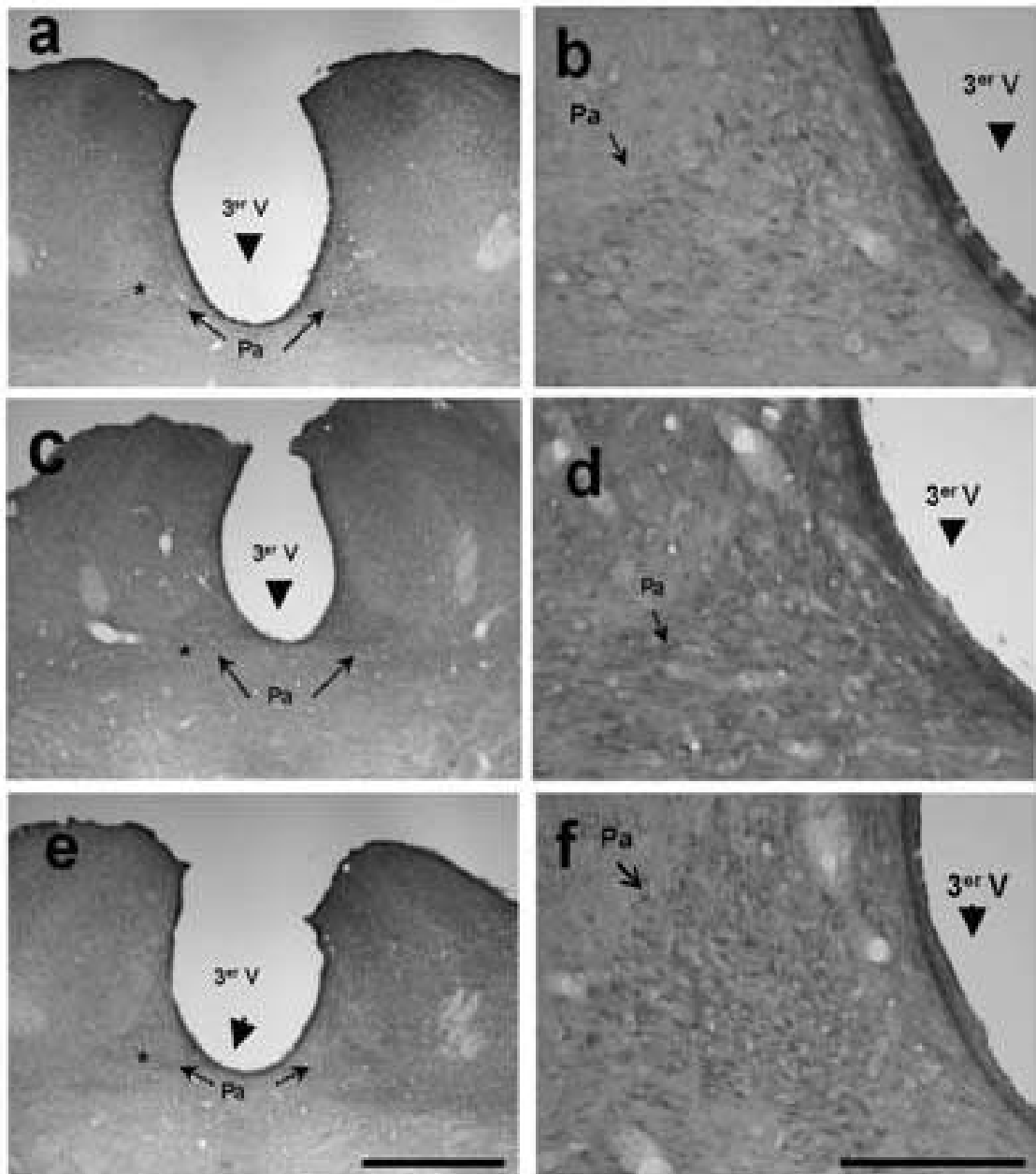


Figura 21 B) En la microfotografía se pueden ver las diferencias de inmunomarcaje para la proteína HSP-90, en el núcleo Pa entre los animales control (a, b), y los animales expuestos a 1,5 W (c, d) y 12 W (e, f) perfundidos 90m después de la radiación. Barras de calibración: (a, c, e) = 250 μ m (b, d, f) = 500 μ m

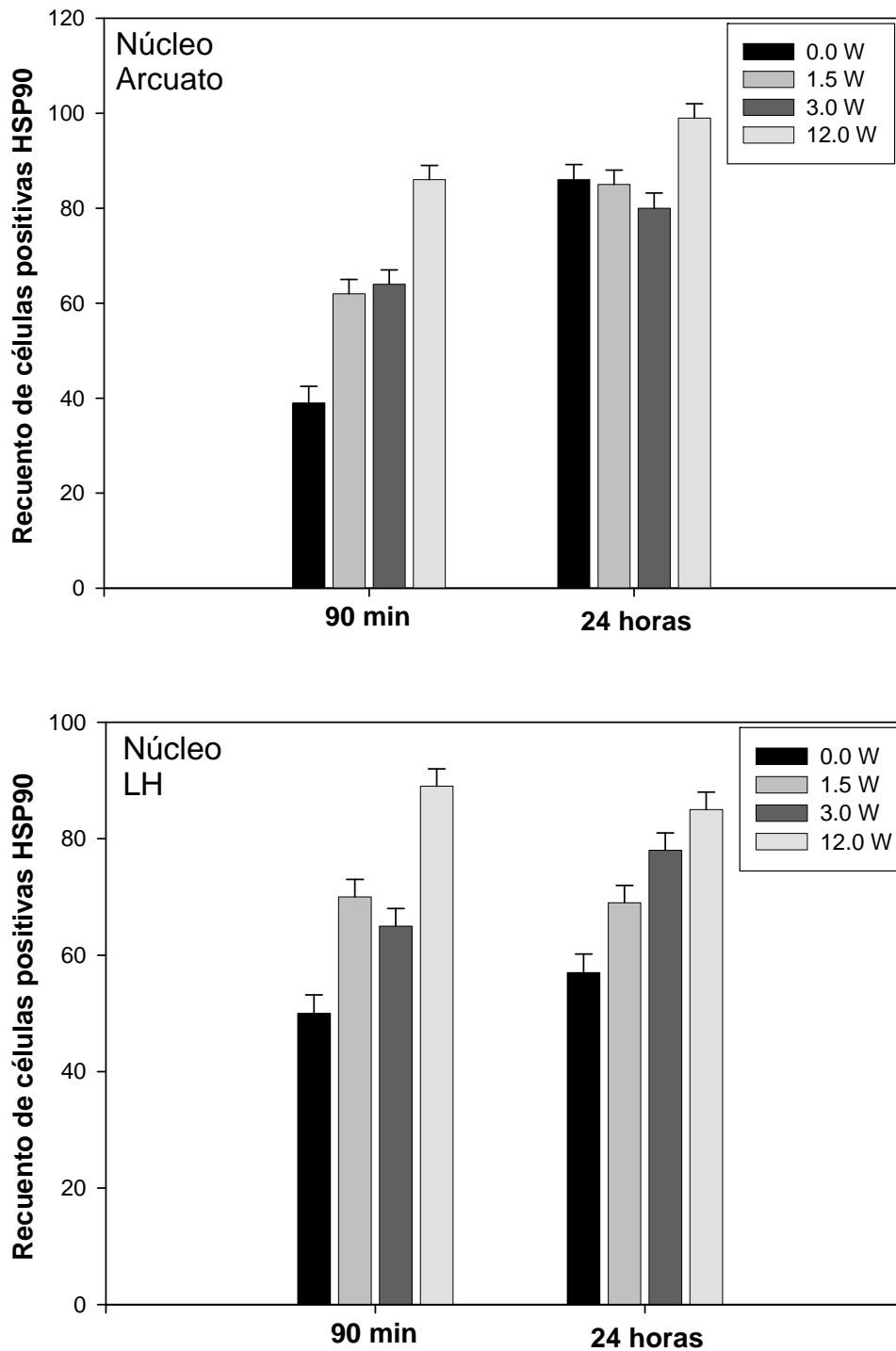


Figura 22 A) y B).- Histogramas del recuento celular que muestra la densidad de neuronas HSP-90 positivas (A) en el Núcleo Arcuato (Ar) (B) en el Núcleo LH (neuronas/mm², media ± E.M) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $P < 0.05$

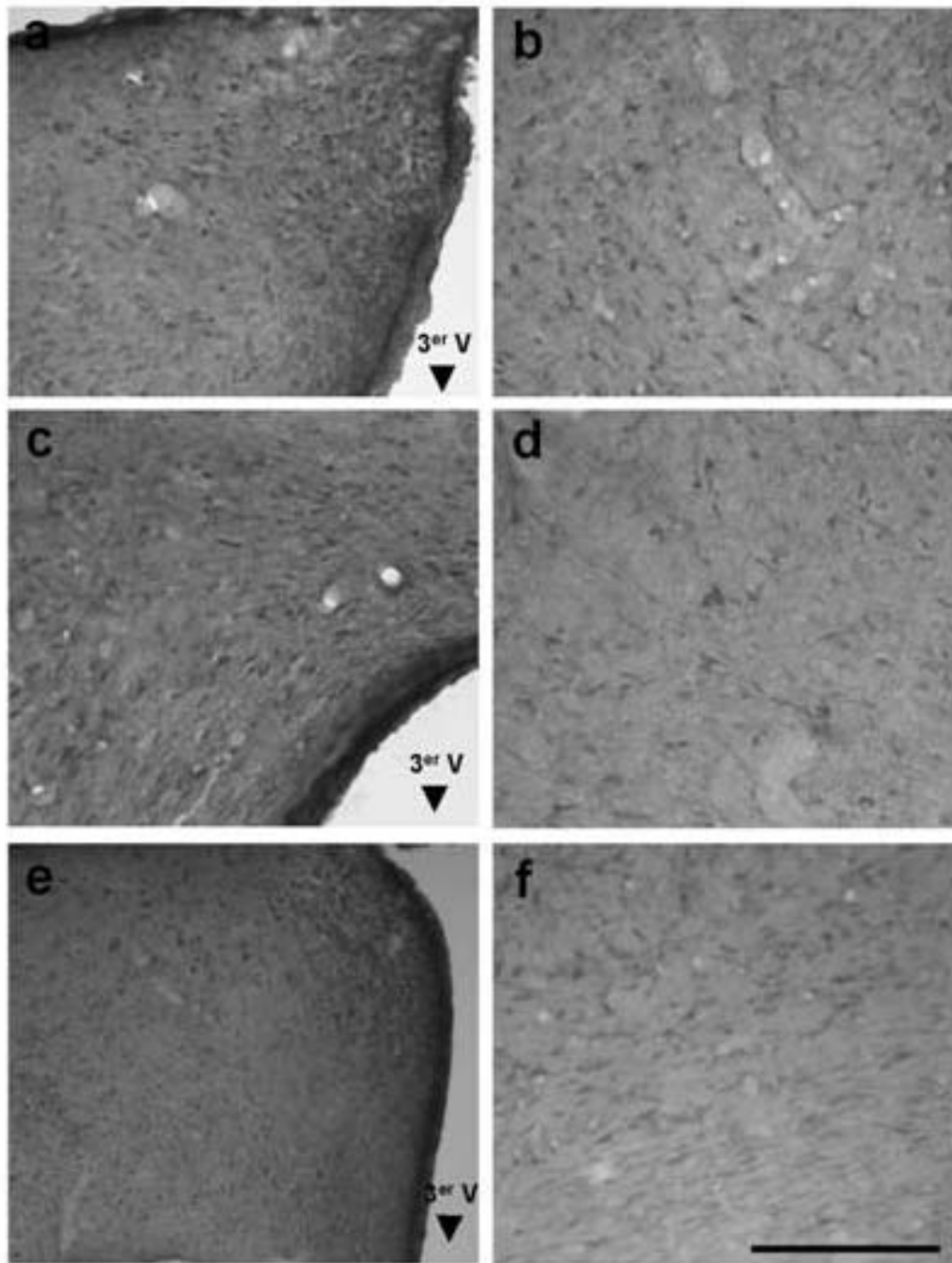


Figura 22 C) En la microfotografía se pueden ver las diferencias de inmunomarcaje para la proteína HSP-90, en el núcleo Arcuato y en LH entre los animales control (a; c), y los animales expuestos a 12 W y perfundidos 90m después de la radiación. Barras de calibración: (a, c)= 250 μm (b, d)= 250 μm

IV.1.6 DISCUSIÓN

A pesar que en diversas publicaciones se asocia la exposición de radiación no ionizante con modificaciones en los niveles de expresión de las hsp (Perez, F.P. y cols., 2008; Wang, J. y cols., 2006; Caraglia, M. y cols., 2005) la mayoría son estudios in vitro, en embriones (Di Carlo, A. y cols., 2002) o estudios in vivo que se relacionan con variaciones térmicas (Sanchez, S. y cols., 2008; Fritze, K. y cols., 1997a). En nuestro conocimiento no hay ningún estudio in vivo donde se hayan descrito modificaciones en la cuantificación y distribución de la proteína HSP-90 en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas después de la exposición aguda y controlada con niveles de SAR no térmicos en una cámara de radiación GTEM a 2,45 GHz en ratas. (ver figuras 17 y 20).

En este estudio encontramos que después de los primeros noventa minutos post-radiación hay un incremento celular de HSP-90 manteniendo el mismo patrón de distribución regional que en la corteza cerebral de la rata no estresada (Gass, P. y cols., 1994; Izumoto, S. y Herbert, J., 1993; Itoh, H. y cols., 1992) similar al que aparece con otros estímulos como la hipertermia (Huang, H. y cols., 1999; Quraishi, H. y Brown, I.R., 1995), la anoxia (Ramaglia, V. y Buck, L.T., 2004) o alcohol (Pignataro, L. y cols., 2007). Al ser la corteza la parte más superficial de la estructura cerebral podría ser la más afectada inicialmente (Lin, J.C., 2003) en relación con la energía de la radiación no-ionizante que absorbe el tejido y que viene dada por la tasa de absorción específica (SAR). Los valores de HSP-90 en la corteza se incrementan paralelamente a los valores de SAR aunque no llegan a niveles térmicos ya que son inferiores a 0.4W/kg en un ambiente controlado en la totalidad del cuerpo (Martínez A., 2004) e inferior a 2W en el cerebro (IEEE, 1999) (ver tabla 9). No se puede decir por tanto que el mecanismo que provoca efectos sobre esta hsp en la corteza cerebral sean propiamente térmicos (D'Andrea, J.A. y cols., 2007); podría ser no térmicos (Lopez-Martín, E. y cols., 2009; de Pomerai, B., 2003; Peinnequin, A. y cols., 2000), o actuar conjuntamente los dos mecanismos (Hyland, G.J.,

2000). Pero en cualquier caso hacen que nos posicionemos del lado de los autores que argumentan que las microondas originadas por los campos electromagnéticos pueden afectar por mecanismos no-térmicos a la estructura tridimensional de las proteínas eucariotas (Mancinelli, F. y cols., 2004; French, W.P y cols., 2001).

En nuestros resultados los niveles subcorticales de la proteína intracitoplasmática HSP-90 aparecen incrementados noventa minutos y veinticuatro horas después de la radiación en los núcleos hipotalámicos con todos los niveles de SAR, contrastando con valores similares de HSP-90 en el hipocampo a los de la rata no estresada hora y media después de la radiación, y un descenso importante un día después. Esta discordancia en los valores de esta chaperona en hipocampo e hipotálamo podrían estar en relación con otros factores como los ritmos circadianos y los niveles de cortisol (Patchev, V.K. y cols.,1994; Kawagoe, J. y cols., 1993; Furay, A.M. y cols., 2006). Pero si además comparamos la respuesta de la HSP-90 en el cerebro de la rata desencadenada por otros estímulos tóxicos como la isquemia en el hipocampo, observamos un pico máximo a las 8 hs (en nuestro caso se estudió a los 90 minutos) y que desciende 1 día después del insulto (Kawagoe, J. y cols., 1993). Interpretamos por tanto que la respuesta del hipocampo podría ser más tardía y asociarse directamente al feed-back del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (Joels et al; 2001) y sin embargo el hipotálamo puede responder antes al estímulo de otras funciones más generales de control homeostático (Vrang,N. y cols., 2003) además de la secreción de corticoides (Siegel, R. y cols., 1980). En todo caso, los estudios de los niveles de corticoides después de la exposición a campos electromagnéticos tampoco aportan datos clarificadores en la bibliografía, ya que en unos casos establecen elevaciones de glucocorticoides en el hipocampo (Li, M.y cols., 2008) o incremento en la sensibilidad de los receptores de glucocorticoides (Khan, G.M, y cols., 2006) o por el contrario una estabilización de los niveles de ACTH y glucocorticoides (Stagg, R.B.y cols., 2001) o una disminución y posterior recuperación a las cuatro semanas (Djeridane, Y. y cols., 2008) de la exposición de las microondas. No podemos por tanto intuir que haya una relación

directa o causal entre los niveles de la proteína HSP-90 y los niveles de estrés asociados al cortisol.

Es muy conocido que se utiliza la inducción de genes tempranos como C-fos y en especial las proteínas de choque térmico que actúan como biosensores de los efectos térmicos y que se incrementan muy rápidamente como respuesta a niveles de exposición de campos electromagnéticos con SAR térmico (Tian, F., y cols., 2002; Wang, S.M.y cols., 1999; Morrisey, R.W., 1999). Sin embargo en recientes trabajos in vivo a otras frecuencias se ha demostrado una importante activación neuronal cortical y subcortical de c-fos (López-Martin et col 2006, 2008, 2009) e in vitro con exposiciones agudas a 2,45GHz en la expresión de diversos genes, entre los que se encuentra una disminución en la expresión de HSP-90 (Lee, S. y cols., 2005) con importantes cambios, sin alcanzar niveles de SAR térmico. Por otro lado existe una relación entre la exposición a los campos electromagnéticos que pueden inducir la inactivación de esta proteína y la activación de proteasas que desencadenan la apoptosis (Caraglia, M., y cols., 2005), habiendo una demostrada disminución de los mecanismos de citoprotección (Di Carlo, A. y cols., 2002). En este sentido, el descenso de los valores de HSP-90, 24 horas después de la exposición a la radiación con la mayoría de los valores de SAR en el hipocampo y en la corteza entorinal sugiere que los efectos de la radiación no ionizante pueden estar relacionados con un descenso en los niveles de protección desarrolladas por esta proteína. Esta pérdida de la función celular de la chaperona que afecta a una gama más amplia de rutas de señalización intracelular que otras HSPs (Srivastava,P.K., 2008) es investigada para mejorar la eficacia de tratamientos antitumorales (Premkumar, D.R.y cols., 2006) y se combinada a veces con radiación ionizante (Shintani, S. y cols., 2006).

La HSP-90 tiene respuestas moleculares diferentes dependiendo del estímulo (Garrido C, y cols., 2001), ésto nos hace reflexionar sobre los resultados obtenidos en este experimento y plantea también la posibilidad de una ambivalencia en los efectos biológicos de la radiación

dependiendo del área anatómica estudiada. Por una parte una activación de mecanismos neuroprotectores mediados por esta proteína (Liu, D.H. y cols., 2007) que en este experimento pueden estar en relación con niveles de HSP-90 altos en la corteza parietal y en los núcleos hipotalámicos y un descenso de los niveles de la chaperona en la corteza límbica e hipocampo podrían indicar una supresión de la función defensiva celular de esta proteína de choque térmico.

En cualquier caso los valores de la proteína HSP-90 en el cerebro de rata indican diferencias importantes entre las regiones estudiadas y por tanto una gran heterogeneidad en los mecanismos de tolerancia al estrés en la corteza cerebral y en el diencéfalo a la radiación no ionizante. Niveles elevados de citoprotección en la corteza somatosensorial e hipotálamo y un acusado descenso de la protección en corteza límbica e hipocampo indican una gran complejidad en los mecanismos de defensa celular así como una variabilidad de la respuesta de las poblaciones celulares a las microondas.

IV.2 EXPERIMENTO 2:

ESTUDIO DE LA RADIOFRECUENCIA A 2,45 GHz EN LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO DE LA RATA.

IV.2.1 Introducción

El sistema nervioso central tiene una gran reactividad a la acción de la radiación de los campos electromagnéticos (Lebedeva, N.N., 1998), a la exposición continua a la que el ser humano se ve sometido por las diversas fuentes electromagnéticas (como televisión, comunicaciones) hay que sumar la utilización de la radiación en la medicina.

El sistema nervioso responde ante estímulos de estrés movilizando la activación de numerosos genes inducibles como la interleukina-2 o endorfinas, así como la activación previa de la expresión del gen c-Fos (Herman, J.P. y Cullinan, W.P., 1997; Imaki, T. y cols, 1995). El análisis de la localización de las células que expresan c-Fos permite determinar la extensión de la activación neuronal en las estructuras nerviosas (Graybiel, A.M. y cols, 1990, LaHoste, J. y cols, 1993; Herrera D.G. y Robertson, H.A., 1996).

Los estudios de los efectos biológicos de la radiación electromagnética en los núcleos hipotalámicos tienen un gran interés ya que se ha demostrado una relación entre la intensidad, localización, duración de los cambios de la expresión del gen c-fos y la naturaleza del estímulo, para ultra high frequency (UHF) (Novikova, N.S. y cols, 2008), extremely high frequency (EHF) (Shanin, S.N. y cols, 2005) y de radiofrecuencia (RFR) que induce estrés térmico (Mickley, G.A. y cols, 1994).

El núcleo Paraventricular (Pa) situado en el hipotálamo anterior constituye un centro regulador de homeostasis corporal (Balklavadzhyan, O.G. 1983; Sawchenco, P.E. y Swanson, L.W., 1981) siendo al mismo tiempo un importante nexo con el sistema límbico (Jankord, R. y Herman, J.P., 2008) y con los centros del dolor (Martinez-Lorenzana, G. y cols, 2009; Condes-Lara, M. y cols, 2006). Este núcleo es sensible y da respuesta con activación neuronal de c-fos a una gran variedad de estímulos (Bullitt, E. 1990) osmóticos (Penny, M.L. y cols, 2005; Mckinley, M.J. y cols, 1994; Sharp, F. y cols, 1991) por calentamiento (Patronas P. y cols., 1998). Además hay una relación entre la población celular que expresa el gen c-fos en este núcleo y el estímulo, así los cambios osmóticos deshidratación y salino hipertónico inducen

inmunorreactividad de c-Fos sobretodo en el área magnocelular (Mckinley, M.J. y cols, 1994, Sharp, F. y cols, 1991) y el estrés de inmovilización provoca activación de poblaciones neuronales correspondientes del área parvocelular (Senba, E. y cols, 1993). El aumento creciente de las fuentes de contaminación electromagnética nos plantea las siguientes dudas: 1) Si la radiofrecuencia con niveles de Tasa de absorción específica (SAR) no térmica ($<4\text{W/kg}$) provocará una respuesta en el núcleo paraventricular 2) Conocer las regiones celulares de éste núcleo que se activan a partir de distintos niveles de exposición.

En este trabajo realizamos un análisis comparativo de los efectos de la activación neuronal en el núcleo paraventricular (Pa) producido por campos electromagnéticos no pulsados a 2450 MHz en ratas, aplicando diferentes potencias de 12 o 3W en exposiciones únicas con tiempos de quince o treinta minutos o exposiciones repetidas con potencias bajas durante dos semanas utilizando en todos los casos una cámara experimental de radiación GTEM (Gigahertz Transverse Electromagnetic). Paralelamente se realizó un control de temperaturas rectales antes y después de la radiación para poder determinar la tasa de absorción específica (SAR) que recibían los animales para cada potencia así como los niveles de estrés a los que estaban sometidos. El estudio morfológico inmunohistoquímico de la proteína c-Fos en regiones diferentes del núcleo paraventricular del cerebro postmortem y el control de la temperatura rectal de los animales nos permitió realizar un balance de la integración de la respuesta de este núcleo hipotalámico al efecto de la radiación no ionizante.

IV.2.2 Tasa de absorción específica (SAR) obtenidos por temperatura rectal T_0

Una vez obtenidos los valores de la tasa de absorción específica como se indica en el material y métodos, los resultados de las exposiciones de 15 minutos no mostraron una relación clara entre los niveles de SAR y las intensidades de las potencias utilizadas para la radiación. Incluso los casos control (0W) presentaron variaciones abruptas de los niveles de SAR y también entre los animales expuestos. Los animales que recibieron exposiciones de 3W presentaron los picos más pronunciados de máximos ($\text{SAR}_{\text{max}}=4,24$) y mínimos ($\text{SAR}_{\text{min}}=0,96$), además sus valores

promediados fueron la mayoría superiores para 3 ($SAR_{AV}=1,77$) que para 12 ($SAR_{AV}=0,77$) W. En ambos niveles de radiación (3 y 12 W) aparece un animal que presentó SAR equivalente negativo, lo que significa que las ratas redujeron su temperatura corporal (ver figura 23A).

Para los grupos con tiempo de exposición de 30 minutos, los niveles de SAR del grupo de 3W se mostraron ligeramente más estables. Las máximas variaciones se encontraron en los grupos control, incluyéndose también algunos animales con SAR equivalente negativo (2 animales). La gran mayoría de los valores del SAR resultaron inferiores en los controles ($SAR_{AV}=0,29$) respecto a los animales expuestos a 3 ($SAR_{AV}=1,06$) ó 12 ($SAR_{AV}=1,74$) W (exceptuando una rata). A su vez los valores de SAR de las exposiciones a 12W ($SAR_{max}=3,47$) son superiores a los de 3W ($SAR_{max}=1,74$). (Ver figura 23B).

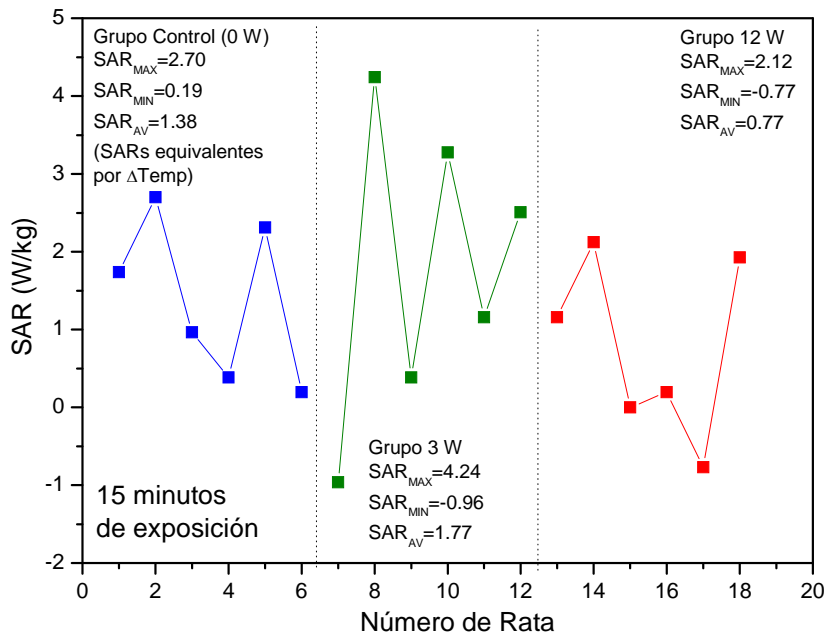


Fig. 23A

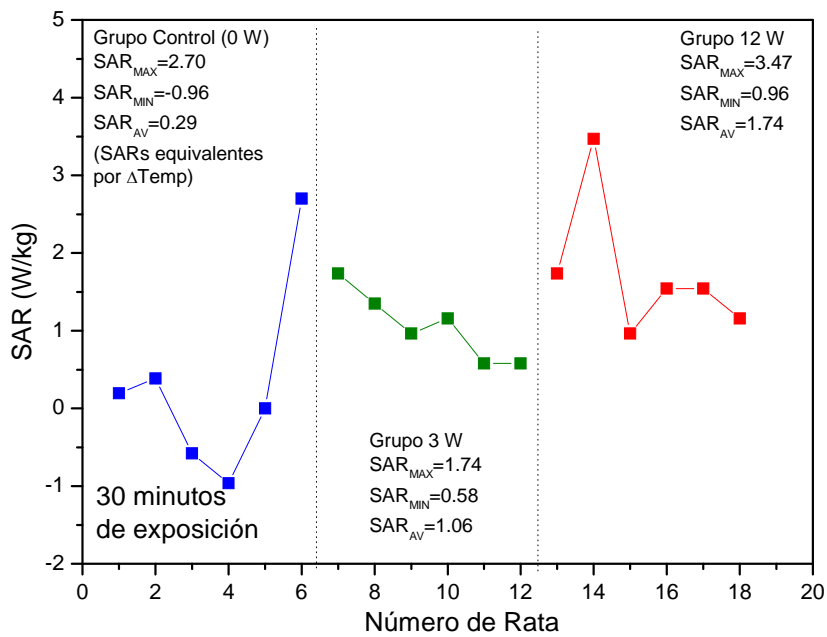


Fig. 23B

Figura 23) Las gráficas A y B representan los valores de la Tasa de absorción específica (SAR) obtenido por las temperaturas rectales para los 3 grupos de animales (0, 3, 12 W de potencia), en tiempos de exposición en la cámara de radiación de 15 minutos (A) y 30 minutos (B). Para cada uno de los grupos se presentan los valores máximos (SAR_{max}), mínimos (SAR_{min}) y el valor medio (SAR_{Av}) del SAR de los animales estudiados ($n=6$ por grupo)

IV.2.3 Comportamiento de la temperatura rectal post-exposición: niveles de estrés

Los grupos de exposición de 30 minutos mostraron una variación más suave, a lo largo del tiempo, de la temperatura media, sobre todo en las ratas expuestas a una radiación de 3W (ver Fig 24B). En ambos tiempos de exposición, los comportamientos de los grupos control resultaron similares, manteniéndose en el rango de los 37 a los 37.25°C. Como puede verse para ambos tiempos de exposición en las figuras 24 A y B las temperaturas rectales de los animales control son en todo momento inferiores a los de los animales expuestos a las dos potencias. Para las exposiciones de 15 minutos, los promedios de la temperatura para cada tiempo estudiado fueron superiores para 12 W, (excepto 1 rata), la temperatura máxima se alcanzó a los 90m postradiación, siendo para el grupo de 3w 24 hs después de la radiación. En las exposiciones a 30 minutos, la temperatura promedio máxima se alcanzó en el grupo radiado a 12W, cuando finalizó radiación en el momento 0. El mismo comportamiento lo tuvieron los animales radiados con potencias de 3 w que alcanzaron los promedios de temperatura mayores justo después de la radiación en el momento cero (ver figura 24 A).

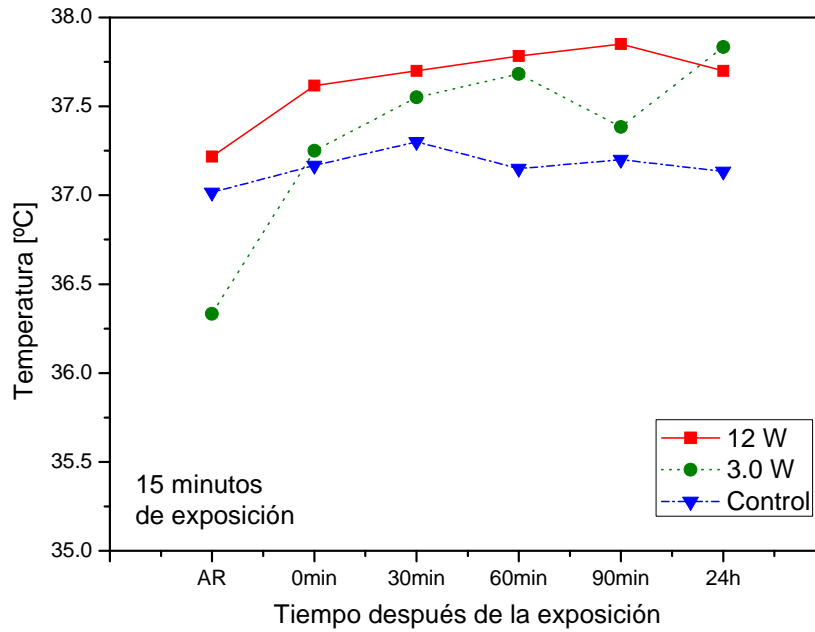


Fig. 24A

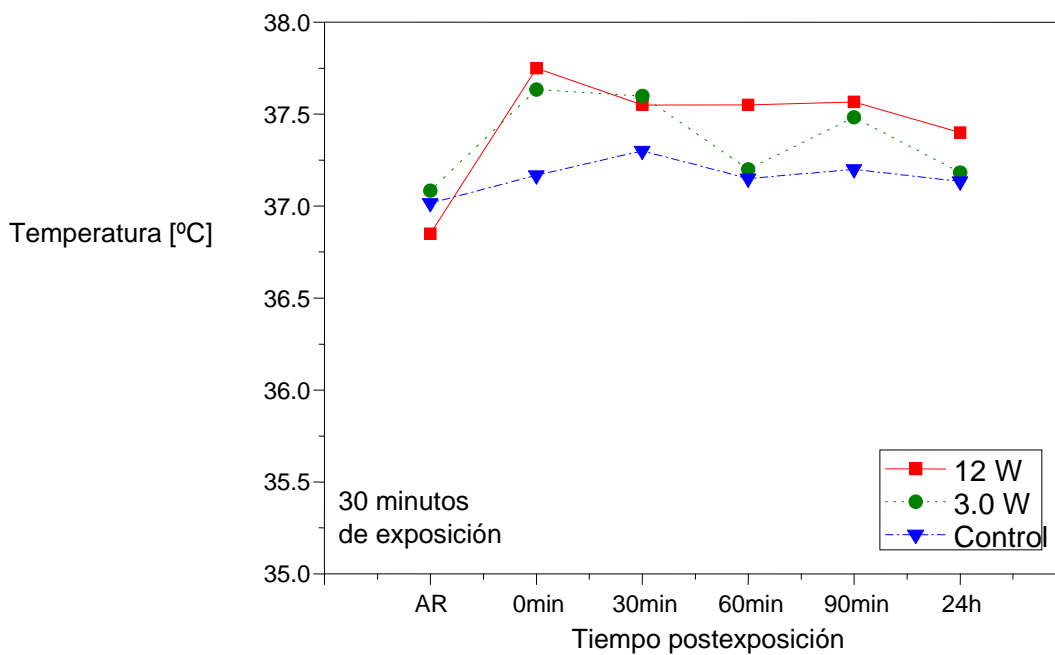


Fig. 24B

Figura 24 Las gráficas A y B representan las temperaturas rectales medias que presentan cada uno de los 3 grupos de animales (0, 3, 12 W de potencia), en tiempos de exposición en la cámara de radiación de 15 minutos (A) y 30 minutos (B). Cada punto representa los valores medios de temperatura rectal de cada grupo ($n=6$ por grupo), 5 minutos antes de comenzar la radiación (AR), finalizada la radiación (0min), 30, 60, 90min y 24 hs después de la radiación.

IV.2.4 Resultados de morfología

La aplicación de radiación mediante microondas a 2450 MHz desencadenó niveles altos de activación neuronal en ambas áreas anatómicas morfológicamente distintas (magnocelular, parvocelular y ventricular) estudiadas del núcleo paraventricular (PVN) cuando se utilizan los niveles más altos de potencia (12W) a los que se expone la cavidad en las sesiones únicas o en sesiones repetidas con los niveles más bajos de potencia aplicados (3W). La descripción de los resultados del recuento de la activación neuronal en el núcleo PVN en los grupos estudiados aplicando un *ANOVA de dos vías* cuyas variables son (*Potencia x Tiempo de exposición*) en exposiciones únicas o (*Radiación x número de exposiciones*) en exposiciones repetidas, son los siguientes:

IV.2.4.1 En exposiciones agudas:

- *Activación de neuronas c-Fos positivas noventa minutos después de la exposición aguda*

El nivel alcanzado de activación neuronal por la radiación es muy similar en las dos áreas anatómicas estudiadas, magnocelular (PaLM), parvocelular y ventricular (PaMP+ PaV) noventa minutos después de la radiación, es por ello que la descripción va a ser conjunta en ambas áreas. Considerando la proporción de neuronas c-Fos inmunopositivas en el PVN en cada una de las áreas mencionadas, se puede ver una significativa influencia en la activación neuronal al incrementarse los valores de la potencia, de tal forma que la expresión de c-Fos es significativamente más alta con el valor más alto de potencia en relación a los animales no radiados ($p = 0.001$). Los recuentos celulares son inferiores en el caso de los animales expuestos a los niveles más bajos de potencia y presentan diferencias estadísticamente significativas con los niveles más altos de potencia ($p < 0.001$) pero no con los animales no radiados.

El intervalo de tiempo de exposición a la radiación no parece que tenga en si mismo efectos significativos ($p=0.098$). Sin embargo considerando los niveles más altos de señal de potencia (12W) aparecen diferencias significativas en los recuentos celulares entre los grupos de animales expuestos a los distintos intervalos de tiempo estudiados 15m y 30m ($p < 0.001$).

Para el intervalo de radiación de 15m no hay diferencias significativas en el recuento celular entre los grupos expuestos a los distintos niveles de potencias ($p > 0.05$). Finalmente si se consideran los grupos de animales con 30 min de exposición, los animales radiados con 12 W mostraron diferencias significativas en el recuento celular con respecto a los animales de los otros grupos, expuestos a 3W ($p<0.001$). Para una mejor interpretación de la radiación, ver los histogramas 25 A y B.

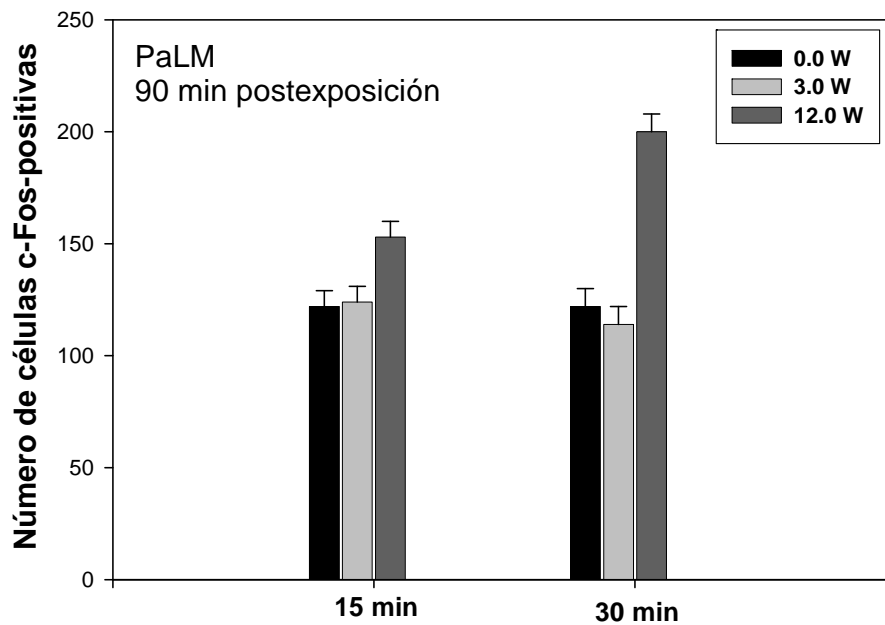


Fig. 25A

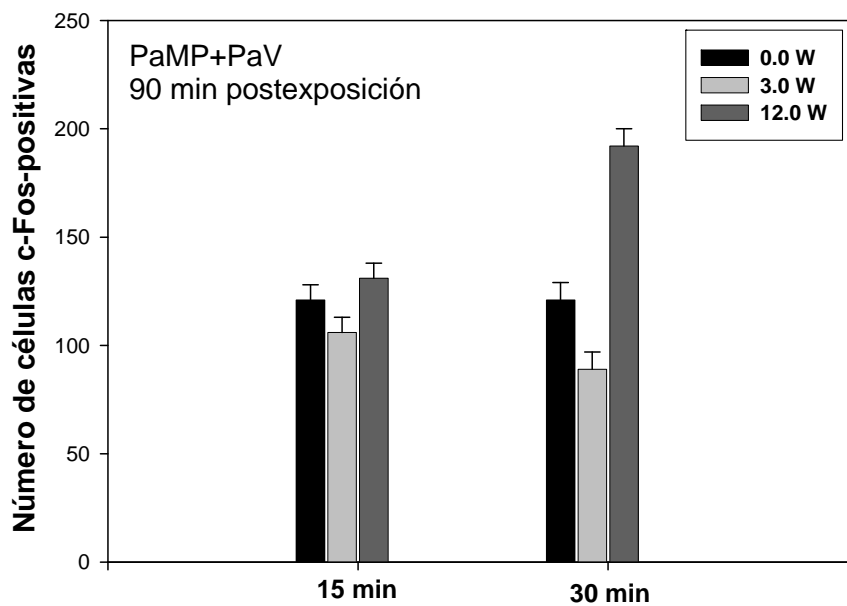


Fig. 25B

Figura 25 A) y B) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas c-Fos positivas en el núcleo paraventricular (Pa), después de la exposición de radiofrecuencia de 2.45GHz **A** En el área magnocelular (PaLM) y **B** En el área parvocelular (PaMP) y ventricular (PaV) (neuronas/mm², media± E.EM) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $p < 0.05$.

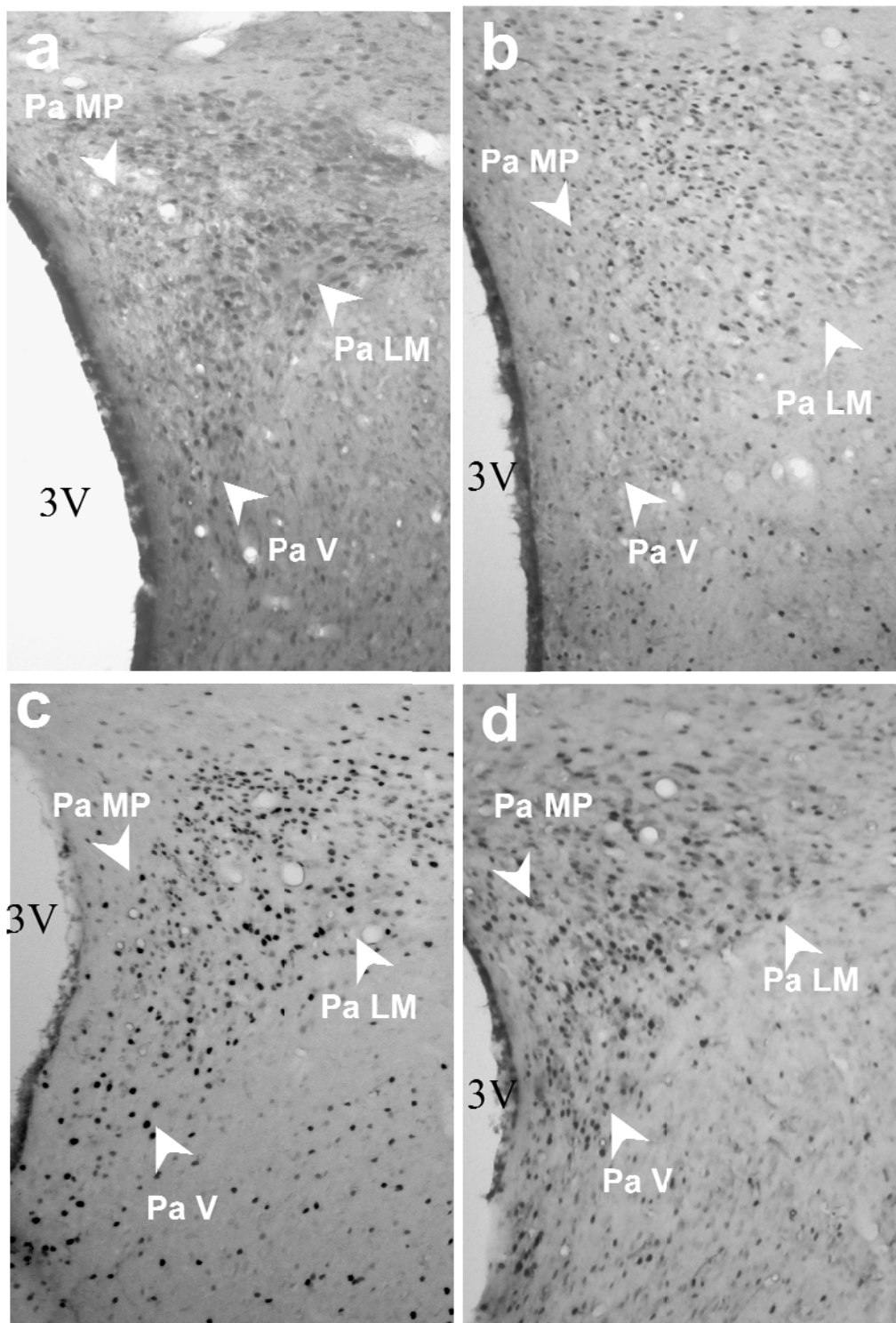


Figura 25 C) En la microfotografía se puede ver la expresión de *c-Fos* entre animales perfundidos a los 90m **(a)** control, no radiados **(b)** radiados 30m a 3w **(c)** radiados 15m a 12 w **(d)** radiados 30m a 12w. Barra de calibración, 75 μ m (10X)

- ***Activación de neuronas c-Fos positivas veinticuatro horas después de la exposición aguda***

Los valores medios de los recuentos celulares de las neuronas c-Fos inmunopositivas en ambas áreas, PaM y PaMP + PaV del NPV mostraron que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) si consideramos los distintos valores estudiados para el factor potencia, los diferentes valores estudiados para el factor tiempo o bien la interacción entre ambos. Las diferencias estadísticas que presentan ambas áreas se describen conjuntamente ya que son similares.

Veinticuatro horas post-radiación las diferencias significativas en el recuento celular en el NPV entre los animales radiados durante 15m y los radiados durante 30m aparecen en grupos expuestos a señales de 3W de potencia ($p < 0.001$). No aparecen, por el contrario estas diferencias significativas entre los animales expuestos a ambos intervalos de tiempo de exposición radiados con potencias máximas (12W) y tampoco entre los controles ($p > 0.05$ en ambos casos).

Cuando los animales son expuestos a la radiación durante quince minutos, las diferencias en el recuento celular aparecen entre animales con el nivel más alto de potencia (12 W) con los otros grupos (0 y 3 W) ($p < 0.05$ en ambos casos) pero no aparecen diferencias significativas entre los animales no radiados y radiados a potencias más bajas ($p = 1$). Con el máximo intervalo de exposición (30 minutos) las diferencias significativas se encontraron entre animales no radiados y los otros dos grupos (3 y 12 W) ($p < 0.001$). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos sometidos a radiación ($p = 0.242$).

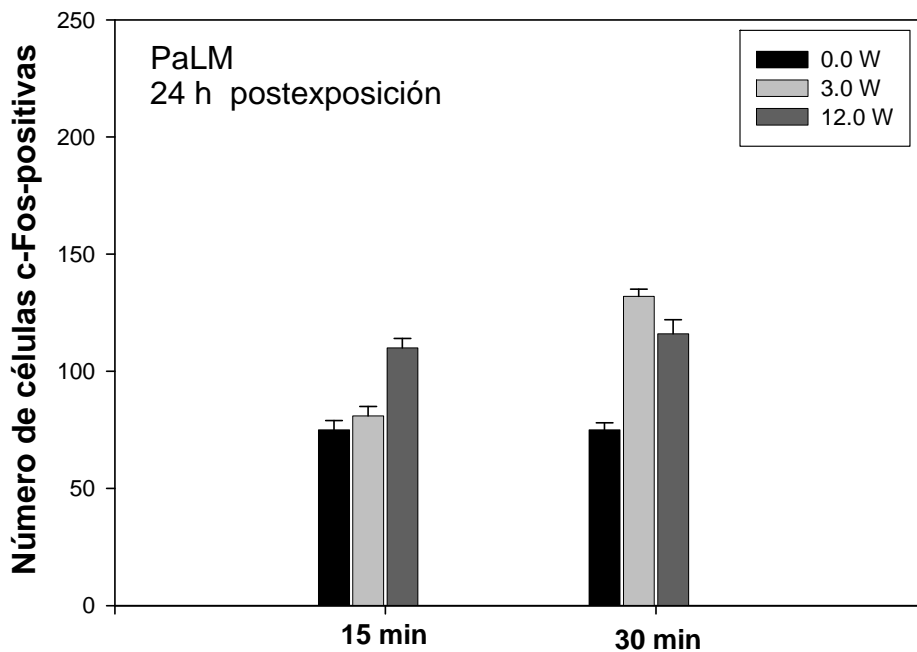


Fig. 26A

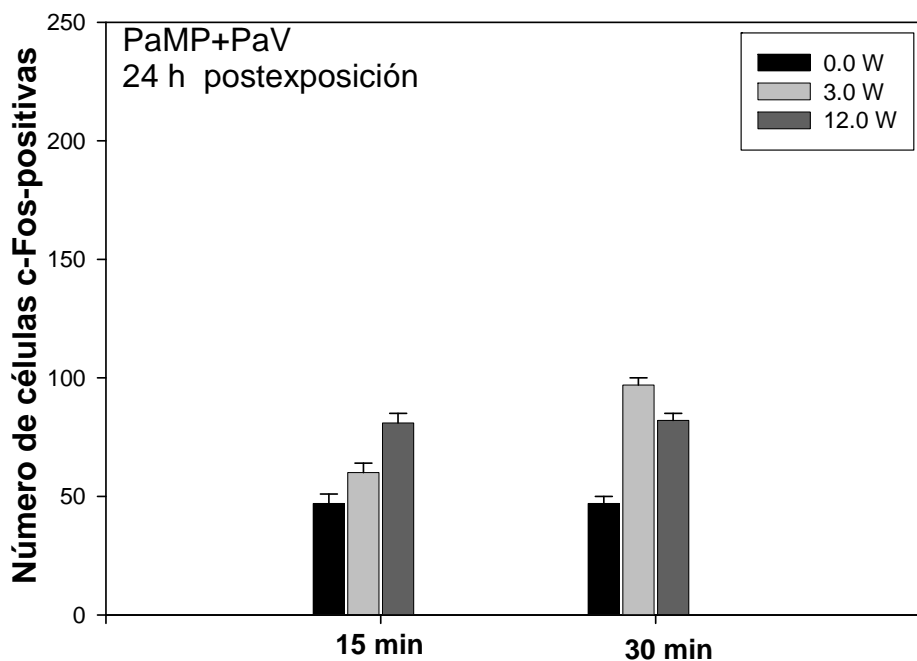


Fig. 26B

Figura 26 A) y B) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas c-Fos positivas en el núcleo paraventricular (Pa), después de la exposición de radiofrecuencia de 2.45GHz **A** En el área magnocelular (PaLM) y **B** En el área parvocelular (PaMP) y ventricular (PaV) (neuronas/mm², media± E.EM) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $p < 0.05$.

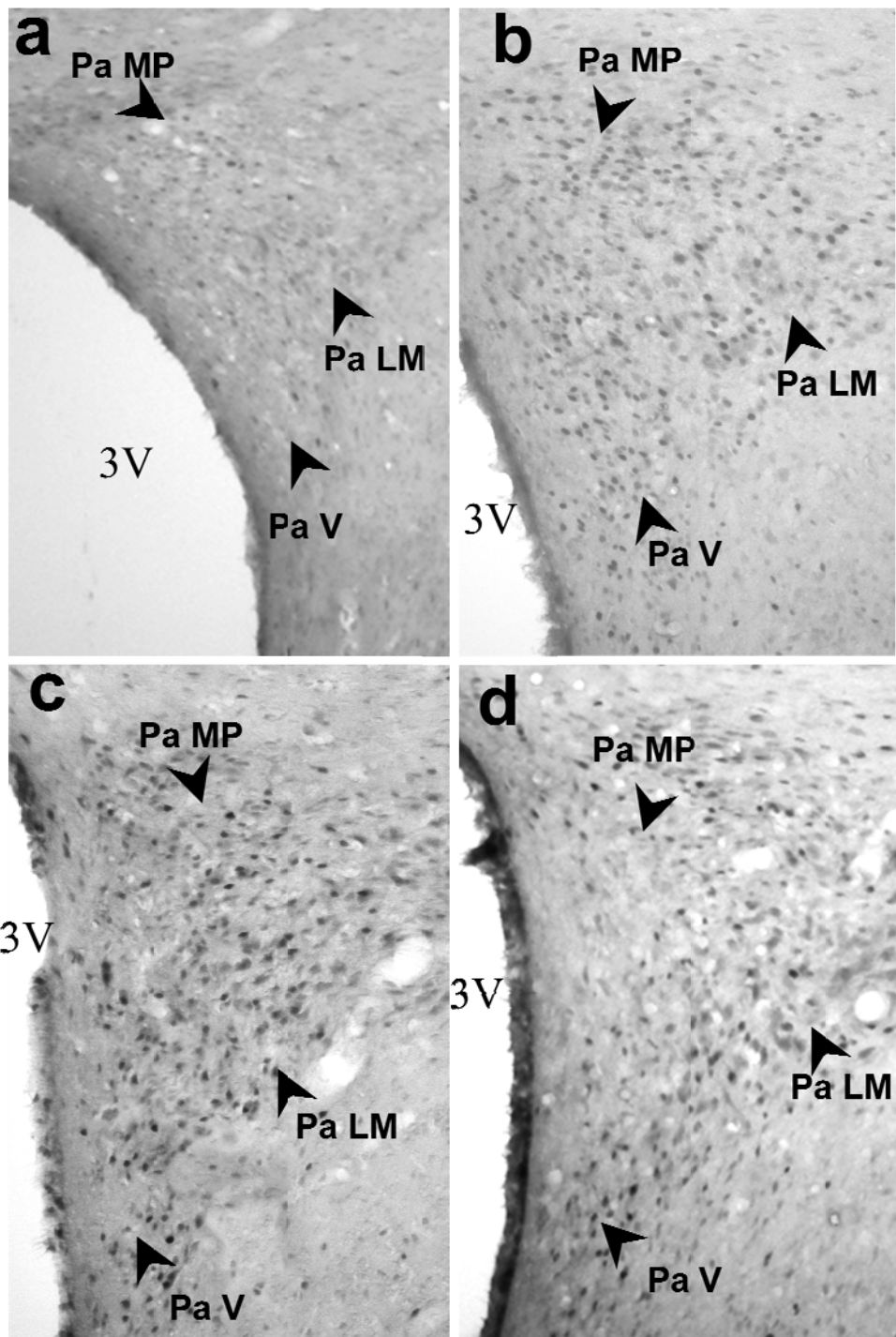


Figura 26 C) En la microfotografía se puede ver la expresión de *c-Fos* entre animales perfundidos a las 24 horas **(a)** control, no radiados **(b)** radiados 15m a 12w **(c)** radiados 15m a 3W **(d)** radiados 30m a 3W. Barra de calibración, 75µm (10X)

2.3.4 Comparación de la activación neuronal de c-Fos entre exposiciones agudas y exposiciones repetidas

- Exposiciones agudas y repetidas a potencias de 3W

La comparación estadística entre los animales expuestos de forma aguda o repetida a potencias de 3w y tiempos de exposición de 30m se describe seguidamente:

En ambas áreas estudiadas la comparación general entre animales radiados y no-radiados es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de igual manera hay diferencias significativas importantes entre los animales sometidos a una sola exposición y exposiciones múltiples ($p < 0.05$).

La exposición a la microonda de forma repetida provocó una activación neuronal importante de núcleos c-Fos en el NPV, así aparecen diferencias significativas con recuentos superiores en un 100% en ambas áreas respecto a los animales con una sola exposición ($p < 0.05$) ver Figura 27 C. Por el contrario no hay diferencias estadísticamente significativas entre el recuento de los núcleos c-Fos de los animales no sometidos a radiación y colocados en el cepo de metacrilato bien de forma única o de forma repetida ($p > 0.05$ en ambos casos).

Los animales sometidos a exposiciones repetidas a la radiación mostraron diferencias significativas en el grado de activación neuronal en relación a los animales no expuestos ($p < 0.05$) en ambas áreas (PaLM y PaMP + PaV) estudiadas del NPV (Ver fig 27 Ay B). Sin embargo en el caso de los animales sometidos a una única exposición a la radiación, el recuento en el área magnocelular no presentó diferencias significativas con los animales no expuestos. Por el contrario en el área parvocelular y ventricular del NPV si aparecen diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de c-Fos entre animales radiados y no-radiados con una única exposición (ver fig 27B).

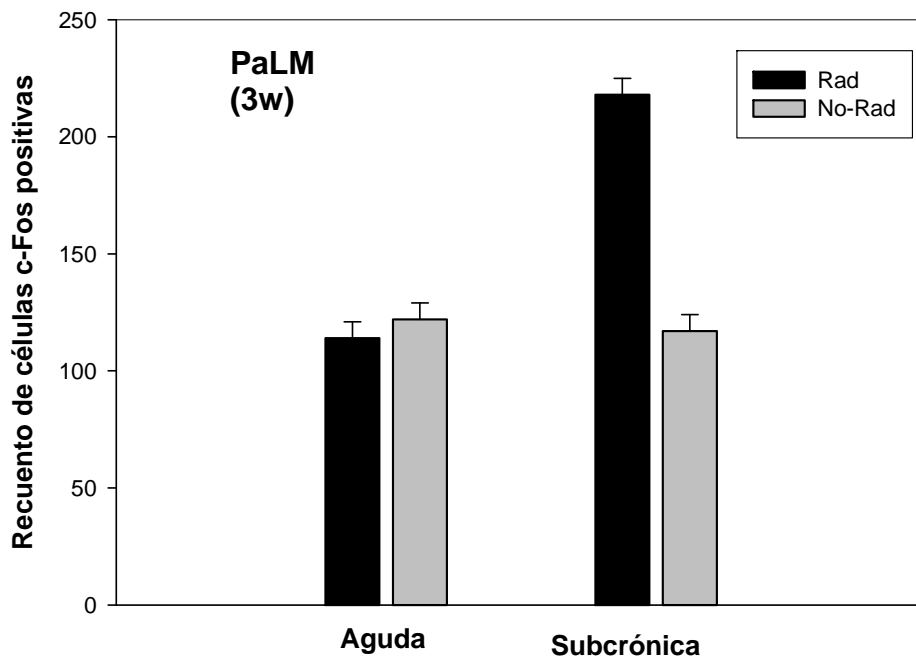


Fig. 27A

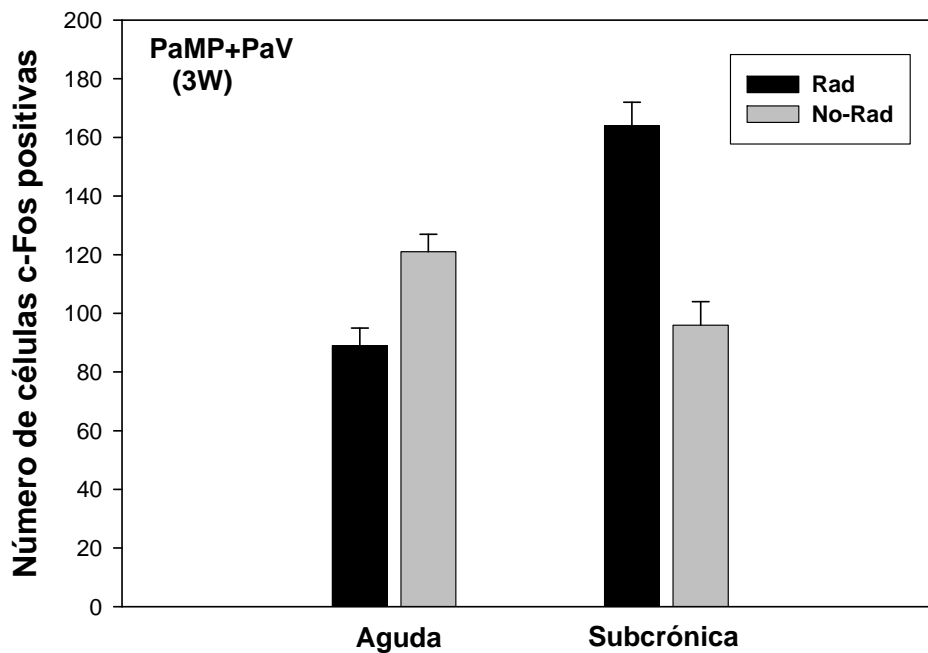


Fig. 27B

Figura 27 A) y B) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas c-Fos positivas en el núcleo paraventricular (Pa), después de la exposición de radiofrecuencia de 2.45GHz **A** En el área magnocelular (PaLM) y **B** En el área parvocelular (PaMP) y ventricular (PaV) (neuronas/mm², media± E.EM) mediante un ANOVA de dos vías y un test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $p < 0.05$.

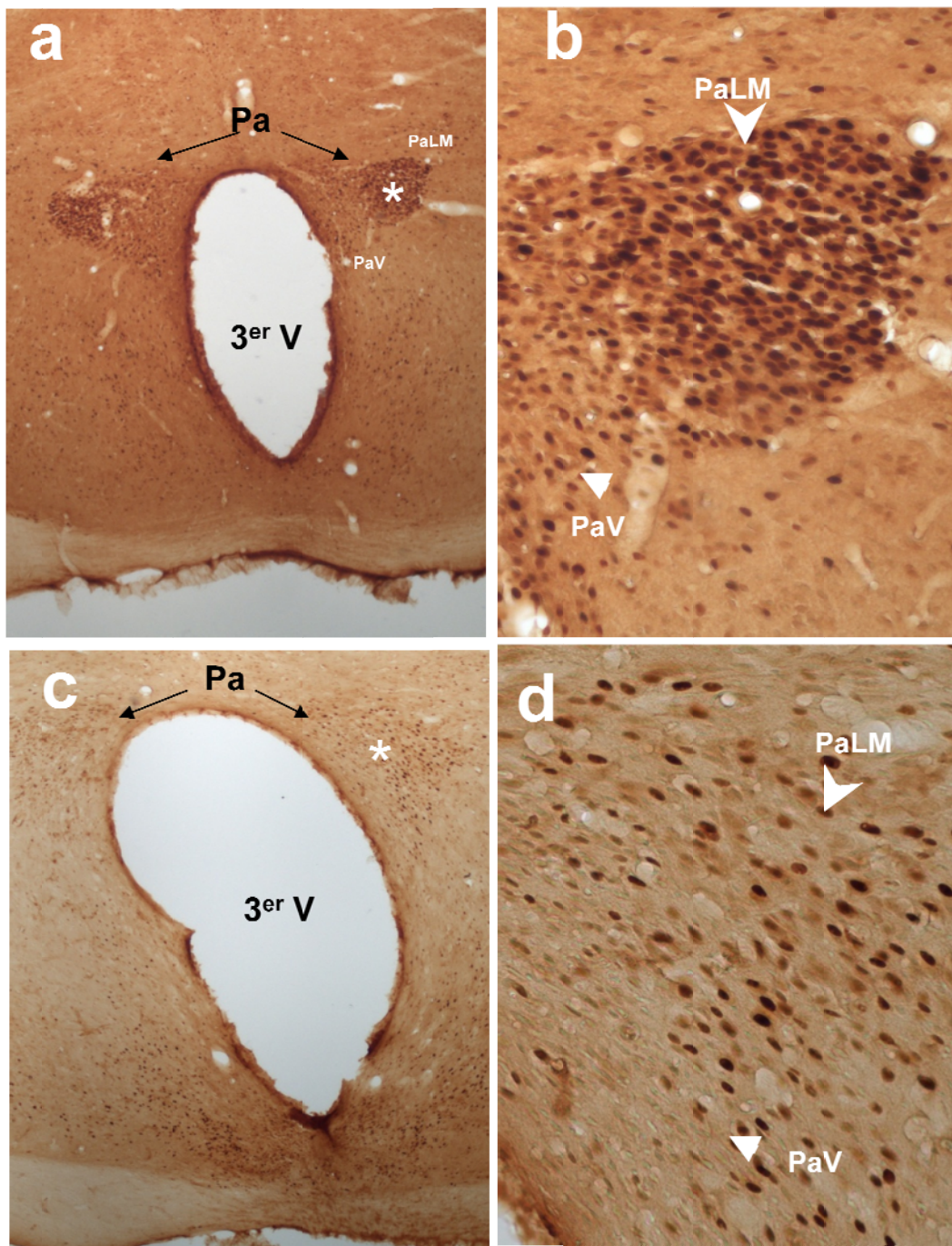


Figura 6 C) En la microfotografía se puede ver la expresión de *c-Fos* entre animales sometidos a exposiciones de 3W (**a, b**) repetidas (**c, d**) unica. Barras de calibración, 100 μm (4X) y 50 μm (20X)

- ***Exposiciones agudas 12 W y repetidas a potencias de 3W***

Ambas áreas Magnocelular y Parvocelular presentan diferencias significativas en los recuentos celulares si comparamos animales radiados y no radiados ($p < 0.05$), dentro del factor radiación. Sin embargo si comparamos animales con exposiciones repetidas y exposición únicas solo aparecen diferencias significativas en el área Parvocelular ($p < 0.05$).

Las comparaciones múltiples de los recuentos celulares en ambos grupos indicaron que no hay diferencias significativas entre los animales expuestos una única vez a potencias de 12 W y los animales expuestos repetidamente a 3w o entre los mismos grupos de animales no radiados ($p > 0.05$). Sin embargo también en ambas áreas hay diferencias significativas importantes cuando se comparan los recuentos celulares entre animales radiados y no radiados cuando los animales son radiados una sola vez a 12w o repetidamente a 3w (ver figuras 28 A y B).

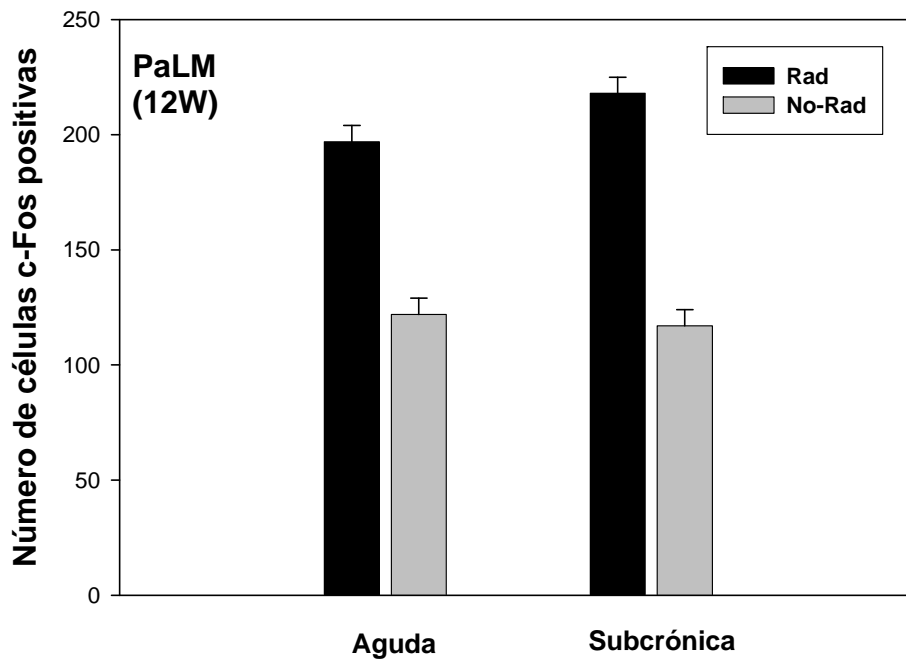


Fig. 28A

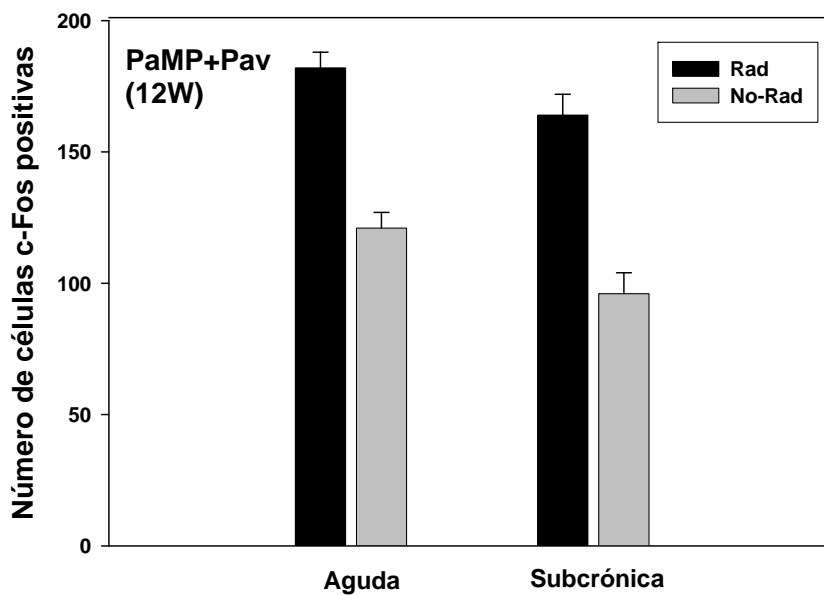


Fig. 28B

Figura 28 A) y B) Histograma del recuento celular que muestra la densidad de neuronas c-Fos positivas en el núcleo paraventricular (Pa), después de la exposición de radiofrecuencia de 2.45GHz **A** En el área magnocelular (PaLM) y **B** En el área parvocelular (PaMP) y ventricular (PaV) (neuronas/mm², media ± E.M) mediante un ANOVA de dos vías y test a posteriori Bonferroni para comparaciones múltiples, considerando como significativas $P < 0.05$ entre animales sometidos a exposición única de 12 W y repetidas de 3W.

2.4 DISCUSIÓN

En este experimento los resultados morfológicos del gen c-Fos se han utilizado como marcador de activación neuronal (Graybiel, y cols., 1990; LaHoste, y cols., 1993; Herrera and Robertson, y cols., 1996; Morrissey y cols. 1999) indicando una importante respuesta del núcleo paraventricular (Pa) del hipotálamo 90 minutos y un día después de exposiciones únicas de 30 minutos con potencias de 12 W, así como en exposiciones repetidas de 3W en las ratas sometidas a la acción de las microondas a 2,45 GHz en la cámara GTEM. Hay que diferenciar tres aspectos distintos en estos resultados: 1) La existencia de un nivel mínimo de radiación única para alcanzar respuesta en el núcleo hipotalámico Pa aunque no llega a niveles de SAR térmico, así como un tiempo de exposición mínimo (30 minutos en este caso) para originar activación de las neuronas de este núcleo. Este hecho indica que la microonda, al igual que otros estímulos que causan activación de c-fos en las neuronas del cerebro, es también dependiente de la intensidad (potencia) y el tiempo de exposición (Palkovits y cols., 2000; Briski, K. y Gillen, E., 2001, Pacak, y cols., 2001) para provocar respuesta en el núcleo Pa ; 2) Una disminución del umbral del estímulo en el núcleo Pa al efecto de la microonda, sugerido por la intensa activación de c-Fos tras exposiciones repetidas pero no en exposiciones únicas empleando la misma potencia de 3W y 3) La obtención de la tasa de absorción específica no puede separarse de la valoración de los niveles de estrés alcanzados por los animales, obtenidos ambos experimentalmente a partir de las temperaturas rectales (Pacák, y cols., 2001) ya que constituyen estímulos solapados en los animales y exigen un control experimental y además son causa de estrés en los animales (Bae, D.D. y cols., 2007). Para no alterar los resultados de la activación neuronal en el cerebro, las mediciones rectales de temperatura en el cálculo del SAR y los niveles de estrés en este experimento, se han realizado a distintos tiempos y en distintos grupos de animales que los estudios morfológicos. Las estimaciones de SAR por temperatura indicaron que los niveles de estrés en las exposiciones de 15 minutos tendrían efectos más importantes que los niveles de radiación. En las exposiciones de 30 minutos la influencia del

estrés no sería tan elevada aunque en algunos casos no habría una relación directa entre niveles de potencia utilizados y SAR obtenido a través de medición de temperatura. Los datos de estimación de la energía absorbida y de los niveles de estrés del animal a través de las mediciones termométricas, nos sugieren que a medida que se incrementa el tiempo de exposición los niveles de estrés serían menos influyentes en la termoregulación de los animales.

El núcleo Pa forma parte de las estructuras anatómicas del hipotálamo de todos los mamíferos que responden con activación neuronal de c-Fos ante estímulos de estrés agudos o crónicos (Joëls, M. y col 2007; Stamp, J.A. y col 1999). De tal forma que este núcleo da respuesta a una gran diversidad de estímulos como cambios de temperatura (Ryan K. y col 2003), calentamiento (Patronas y cols, 1998), estímulos osmóticos (Mackinley y cols 1994; Sharp F. y cols., 1991), hipoglucemia (Niimi y cols., 1995), además del estrés causado por la inmovilización (Kononen y cols., 1992). El estudio de la expresión de este gen o de otros ha sido utilizado como marcador de activación neuronal in vivo en gran variedad de trabajos para investigar el efecto de las microondas (Whithehead, T.D. y cols, 2006; Finne, y col., 2005; Fritz, y cols., 1997) en el sistema nervioso, en muchos casos se obtuvieron resultados que se han interpretado como causados por la inmovilización de los animales más que debidos la irradiación (Stagg, R.B., y cols., 2001). Los animales de este experimento han sido colocados en un cepo durante el tiempo que ha tenido lugar la radiación, hay por tanto una activación inicial del núcleo Pa causado por estrés de inmovilización (Pacák, y cols., 2001), sin embargo estudios previos determinan que la expresión de c-fos es máxima a los 30 minutos y desaparece a los 120 minutos (Cullinan, W.E. y cols., 1995). En este experimento hemos encontrado una importante activación de c-Fos en el núcleo Pa de los animales expuestos a potencias altas de radiación respecto a animales no radiados y aunque ambos grupos de animales están sometidos a estrés de inmovilización, ciertos niveles de la irradiación podrían constituir un estímulo físico que se sumaría a un estímulo emocional (Pacák, y cols., 2001). En el caso de los animales sometidos a exposiciones repetidas, la magnitud del estrés por inmovilización va disminuyendo

con la habituación (Pacak y cols., 1992; Shibasaki, y cols., 1995), hecho constatado con la activación neuronal de c-fos de los controles crónicos. Las mediciones de temperaturas rectales realizadas en los animales irradiados hasta veinticuatro horas después de la radiación están relacionados con los niveles de estrés (Berend Olivier y cols., 2003), estos valores termométricos también corroboran los resultados morfológicos ya que no se igualaron con los valores de los animales no radiados. Pueden llamar la atención algunos valores de SAR negativos obtenidos en varios animales con o sin irradiación, sin embargo la obtención de la Tasa de absorción específica (SAR) mediante las temperatura rectal puede haber influencia de la temperatura ambiente (Bratincsák, y cols., 2004) o el nivel de producción de opioides endógenos del animal causado por el estrés (Bilkey-Gorzo, y cols. 2008) o incluso la producción de opioides puede ser causada por efecto de las microondas (Radziewsky, y cols.,2008). El importante incremento en la expresión de esta proteína 90 minutos después de que una única exposición a la radiación ha sido finalizada respecto a los animales no radiados, nos hace pensar que la microonda puede constituir un estímulo que provoque una alteración génica transitoria también relatada por otros autores (Belyaev, I.Y.y cols., 2006; Lee y cols., 2005) o que nosotros mismos evidenciamos en otros modelos biológicos (López-Martín, y cols.,2006, 2008, 2009).

Numerosos estudios de la actividad cerebral han demostrado reactividad provocada por los campos electromagnéticos en el sistema nervioso central, alterando la actividad bioeléctrica del cerebro (Sidorenko, y cols., 2002; Beason, R.C. y cols., 2002) o causando modificaciones en la duración, intervalos y regularidad de la excitabilidad de las poblaciones neuronales del núcleo supraóptico (Minasyan SM, y cols., 2007) o cambios provocados a veces por pequeños incrementos de temperatura de 0,2- 0,3 grados son suficientes para activar los centros de termorregulación del hipotálamo (Adair y cols.,1997,1984). Cuando la radiofrecuencia provoca niveles de estrés térmico se han descrito alteraciones en la concentración de aminoácidos (Mason y col 1997) o en el caso de que sean no térmicos, de noradrenalina (Inaba y cols., 1992)

y de la acetilcolina (Lai, y col. 1989) a nivel del hipotálamo. Además la extensión de los efectos de la radiación no ionizante está descrito que puede afectar a regiones del cerebro como el sistema límbico (López Martín y cols., 2006, 2009, Lebedeba, y cols.,1998) que a su vez establece conexiones importantes con las neuronas del núcleo paraventricular lo que sugiere que este acúmulo de neuronas que realizan un importante papel en el control nervioso, endocrino y del sistema autónomo provocados por gran variedad de estímulos (Imaki y cols.,1992,Wotjak C.T. y cols., 2001,Viau, y cols., 2002) pueda activarse por acción de la radiación no-ionizante también a través de las conexiones que establece con otras estructuras cerebrales.

Las escasas diferencias en los recuentos neuronales de la expresión de c-Fos respecto a los controles, con tiempos de quince minutos de radiación (ver figuras 25 y 26, A y B), corroboran las afirmaciones de otros autores de que la fuerza y duración de la acción de los estímulos de estrés, en este caso la microonda, son importantes determinantes de la activación celular del sistema nervioso (Kovacs y col, 1998). Así, la acción de la microonda a potencias de 12w con tiempos de 30m es suficiente para estimular tanto el área magnocelular, como parvocelular, o periventricular del núcleo Pa como se puede observar figuras 25 y 26, por los altos niveles de c-Fos de los animales radiados respecto a los no radiados. Noventa minutos después de la radiación tiene lugar la activación de poblaciones celulares tan heterogéneas en este núcleo, como las neuronas magnocelulares sensibles a los cambios de agua y electrolitos (Jhonson AK y col Bulletin) o de oxitocina que se activan en condiciones de estrés (Robinson DA y cols., 2002) y parvocelulares y periventriculares, encargadas de liberar CRH (Coveñas y col., 1993). Esta falta de discriminación en la respuesta de la activación neuronal del núcleo paraventricular a las microondas nos hace pensar que podrían estar implicados varios circuitos funcionales poniéndose en marcha simultáneamente distintas vías (Pacák, y col., 2001). En nuestros resultados es muy llamativo el nivel tan importante de activación neuronal tras exposiciones repetidas de radiación a 2.45GHz con potencias de 3W (SAR no térmico) en el área magnocelular observándose incrementos superiores al 100% en relación a los animales con

exposición única o los controles crónicos (ver fig 27 A y B). Tenemos conocimiento de que la activación de las neuronas neurosecretoras magnocelulares en el núcleo paraventricular por estimulación con irradiación de la piel a distintas frecuencias del espectro electromagnético con ultra high frequency UHF (Novikova y col., 2008) o bien extremely high frequency (EHF) (Shanin y col., 2005) se han utilizado experimentalmente para disminuir el dolor (Novikova y col., 2004,2002) o activar el eje hipotálamo-hipofisario en terapias en diversas patologías (Sidorov y col., 1992,1991). Investigaciones recientes indican que el núcleo paraventricular tiene un papel importante en la analgesia (Yang J y col 2009,2008; Martinez-Lorenzana y col 2008; Yang J, 2006). El análisis de los resultados de la exposición de la radiofrecuencia de 2,45 GHz en las ratas de este experimento revelan una gran activación de poblaciones celulares de este núcleo, por este motivo nos cuestionamos si la aplicación de la microonda podría tener un papel en la nocicepción a través del núcleo paraventricular del hipotálamo. Un estudio experimental en mayor profundidad del hipotálamo donde se module la respuesta del mismo en relación a la exposición de la microonda puede conducirnos a la exploración de nuevas estrategias que impliquen la participación del núcleo paraventricular. En cualquier caso la reactividad del núcleo paraventricular a estímulos físicos como las microondas resulta positiva no solo con niveles de exposición térmica (Mason PA y col 1997) sino también no térmica como muestran los resultados de este trabajo, lo que sugiere que la información generada es también transmitida a través de sensores no térmicos de la piel al núcleo paraventricular del hipotálamo, relacionado también con el dolor (Robinson DA y col 2002) o con receptores de CRF (Makino y col 2005) sensibles al estrés por inmovilización. Sin embargo necesitamos un conocimiento más amplio del umbral de dosimetría que genere reactividad después de la exposición a radiofrecuencia a 2,45GHz en las diversas poblaciones celulares del núcleo paraventricular que además nos permitirá integrar los efectos biológicos causados por la radiación ionizante con otras estructuras anatómicas que responden a este estímulo físico.

V.DISCUSIÓN GENERAL

La microonda es capaz de activar la respuesta celular mediante la estimulación de la expresión de ciertos genes sensibles al estrés, como c-fos y las hsps (Walters, T.J. y cols., 1998; Morrissey, R.W. y cols., 1999; Hossmann, K.A. y Hermann, D.M., 2003). Las investigaciones en cuanto a la respuesta de estrés celular determinada por la sobreexpresión de las proteínas del choque térmico abrió un amplio campo de investigación encaminado a determinar posibles efectos adversos para la salud tras la exposición a CEM no ionizantes. Los primeros estudios apoyaban el origen térmico de este efecto. Sin embargo, posteriores autores observaron el incremento de dichas proteínas incluso a valores de SAR por debajo de umbrales que puedan causar aumento de temperatura (De Pomerai, D.I. y cols., 2003; Caraglia, M. y cols., 2005). Como consecuencia, se generó un amplio debate en cuanto a la posible existencia de efectos de origen no térmico, que a largo plazo pudieran constituir un potencial riesgo para la salud, que se ha mantenido hasta la actualidad. En esta Tesis empleamos valores de SAR por debajo de umbrales térmicos, por lo que los resultados obtenidos podrían ayudarnos a esclarecer esta cuestión.

Partimos del hecho ya descrito por otros autores de que las características fisiológicas del SNC determinan que este tejido responda en mayor o menor grado a estímulos físicos como la radiación (Lebedeba, N.N., 1998), por ello, nosotros hemos intentado profundizar más en este hecho realizando un estudio anatómico topográfico que determine la variabilidad de la respuesta de las diferentes regiones anatómicas y de sus poblaciones celulares.

Hemos empleado marcadores biológicos (c-fos y hsp90) que nos permitan crear mapas de respuesta neural al estímulo de la microonda. Hasta nuestro conocimiento no existen estudios que valoren la expresión de estas proteínas en una amplia variedad de áreas cerebrales de ratas expuestas a 2,45 GHz de radiación microonda, a dosis atérmicas.

V.1- REGIONES ANATOMICAS A ESTUDIO. VIAS DE PROPAGACION DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNETICOS.

A través de la determinación de la expresión del marcador de estrés celular hsp90 hemos detectado que la radiofrecuencia a 2,45 GHz provoca una estimulación heterogénea a nivel de las diversas áreas encefálicas estudiadas. Este **patrón de distribución** coincide con la distribución de hsp90 en el SNC en condiciones normales (Gass, P. y cols., 1994), y podría indicar que la sensibilidad al estímulo de la microonda difiere en cada área, o también que el papel de hsp90 pueda ser diferente según la población celular (Loones, M.T. y cols., 2000). Cuando las hsps son inducidas se produce una respuesta que varía en función del tipo de estímulo fundamentalmente (Chen, S. y Brown, I.R., 2007), y se cree que viene determinado por las funciones específicas de cada hsp. Ha sido estudiada la respuesta de hsp90 en el SNC en diversas situaciones de estrés, como la hipertermia (Hsiu-chin Huang et al 1999; Hania Quraishi et al; 1995), la anoxia (V Ramaglia and Lesli T. Buck, 2004) o alcohol (Pignataro et al; 2007); sin embargo no hemos hallado ningún estudio que valore la respuesta de hsp90 en el SNC frente a un estímulo de microonda a 2,45 GHz.

Nuestros resultados muestran que mientras en la *corteza somatosensorial* y en el *hipotálamo*, la expresión de hsp90 aumenta, en el área del *sistema límbico* ocurre lo contrario. En primer lugar debemos considerar el **factor de localización**, de manera que las áreas más superficiales pueden ser las más sensibles a la radiación ya que reciben mayor estimulación. De hecho, en nuestro estudio la *corteza somatosensorial* muestra una respuesta que se incrementa de forma paralela a los niveles de SAR, presentando su mayor expresión a las máximas potencias (12w). Nuestra hipótesis es que la corteza parietal absorbe la energía generada por la microonda y estimula la producción de esta proteína de forma directa.

El efecto contrario obtenido en el área hipotalámica frente al área límbica puede resultar paradójico en el sentido de que ambas áreas presentan una localización subcortical y además constituyen áreas cuyos circuitos neurales se encuentran interconectados, por lo que les correspondería un comportamiento similar. Sin embargo, podría explicarse porque la sobreexpresión de hsp90 a nivel de los *núcleos hipotalámicos* (*Arc*, *Pa* y *LH*) a todas las potencias, se encuentre relacionado con el estímulo por estrés. Los núcleos que hemos estudiado constituyen áreas que intervienen en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Senba, E. y Ueyama, T., 1997), y que regulan la homeostasis del organismo a través de la secreción hormonal, como los glucocorticoides (Bowers, S.L. y cols., 2008). Dado que hsp90 participa en el complejo GC-rt, es predecible que dichas áreas se vean estimuladas en esta situación (Grad, I. y Picard, D., 2007). A nivel del hipocampo, varios estudios indican que no existe una influencia directa del estrés por inmovilización en la sobreexpresión de hsp90 (Jun, S.J. y cols., 2002). Esta respuesta tan impostante de estos núcleos podría indicar, en resumen, por una parte una estimulación directa de la radiación no ionizante en esta región extraordinariamente receptiva a múltiples estímulos. Pero también la integración de estímulos indirectos provocados por la radiación a través de la piel o de otros órganos endocrinos.

La disminución paralela de hsp90 a las 24 horas de la irradiación en la corteza entorrinal y en el hipocampo indica una susceptibilidad celular similar en ambas áreas anatómicas y posiblemente una vía de propagación común a través del sistema límbico.

Nuestros resultados y los de otros autores sugieren que las hsp poseen efectos citoprotectores diferentes incluso entre las diversas estirpes celulares (Latchman, D.S., 2004; Li, F.C.H. y cols., 2005) y este efecto probablemente dependa también del tipo de estímulo (Mailhos, C. y cols., 1994).

Dada la importante implicación del *núcleo Paraventricular (nPa)* en los circuitos neuroendocrinos que regulan determinados procesos fisiológicos a nivel del SNC, como los procesos de termorregulación y los del estrés (Kwon, M.S. y cols., 2006; Cham, J.L. y Badoer, E., 2007), hemos profundizado en el estudio del mismo, mediante la detección del marcador de estrés neuronal, c-fos, en dicho núcleo, tras la exposición de ratas a microonda a 2,45 GHz en la cámara GTEM, tanto en exposiciones agudas como en exposiciones subcrónicas. Nuestros resultados muestran una importante respuesta del n.Pa tras exposiciones agudas a potencias de 12w y en exposiciones repetidas de 3w.

Se ha descrito incremento de c-fos en el cerebro de ratas expuestas a microonda con valores de SAR superiores a los estándares de exposición recomendados, por lo que se relaciona este efecto con un estrés térmico en combinación con un stress de inmovilización (Morrisey y cols.,1999). Es verdad que debemos tener en cuenta que el estrés térmico o el de la manipulación de los animales, tales como la inyección intraperitoneal de anestésico o la propia inmovilización, es capaz de inducir la expresión de c-fos en el SNC, dado que determinados núcleos cerebrales como el n.Pa forman parte de circuitos neuroautonómicos que intervienen en el estrés (Senba, E.and Ueyama, T., 1997; Tavares, R.F. y cols., 2009). En nuestro estudio, los animales han sido colocados en un cepo durante el tiempo que ha tenido lugar la radiación, por tanto existe una activación inicial del n.Pa causado por el estrés de inmovilización (Pacák, y cols., 2001). Sin embargo, el estímulo es mayor en animales radiados a altas potencias que en los controles, que han sido sometidos a la misma inmovilización pero no han recibido radiación, lo que puede indicar que existe un estímulo físico añadido al estrés de inmovilización provocado por la propia radiación. En cuanto al estrés térmico, los valores de SAR de nuestro experimento se han encontrado siempre por debajo de umbrales térmicos, y ello ha sido corroborado con mediciones termométricas de temperatura rectal en los animales, por lo que

consideramos que los efectos encontrados no tienen porque corresponder a efectos de naturaleza térmica.

Resulta interesante destacar que la activación neuronal en el núcleo Pa parece ser **dependiente de la potencia, y del tiempo de exposición**, lo que coincide con los resultados de otros autores (Kovács, y cols., K.J.).

En relación con la potencia, se observa un incremento paralelo de la expresión del Hsp-90 a nivel de corteza somatosensorial, y núcleos hipotalámicos a los 90 minutos, que se mantiene a las 24 horas; y un descenso paralelo a nivel del área límbica a las 24 horas, a partir de 3 w. Además para la estimulación de c-fos existe un *umbral mínimo de potencia* necesario para estimular el nPa, ya que la exposición aguda a 3w es insuficiente para detectar activación neuronal a los 90m, sin embargo a 12 w existe un importante incremento de la expresión de Fos, suficiente además para activar ambas regiones, magnocelular y parvocelular. .

En relación con el tiempo de exposición, podemos observar que, a mayor tiempo de exposición, mayor expresión de c-fos, ya que con tiempos de 15 minutos de exposición no se obtienen diferencias estadísticamente significativas con los controles.

Hemos valorado también los efectos de la **exposición repetida** de radiofrecuencia a 2,45 GHz, mediante la detección de c-fos en el núcleo Pa tras exposiciones subcrónicas a dosis atérmicas a diferentes potencias. Llama la atención que mientras la exposición aguda a 3 w resulta insuficiente para detectar activación neuronal en el núcleo Pa a los 90 minutos, en exposiciones repetidas a dicha potencia sí provocan un importante incremento de c-Fos, sobre todo a nivel del área magnocelular. Cabría esperar que la estimulación en dicha área se encontrara disminuida si estuviera bajo los efectos del estrés de inmovilización, ya que a dosis crónicas el efecto del stress se ve mermado por los mecanismos de adaptación. Además, el estrés agudo provoca incremento de c-fos en n.Pa y Arcuato, observándose que este estímulo decrece

con el estrés repetido (Kwon, M.S. y cols., 2006), por tanto no parece que el efecto obtenido sea debido al estrés sino que pueda corresponder con el efecto de la propia radiación.

Además, se ha detectado alteración en la función de neuronas hipocámpales tras la exposición a dosis crónicas atérmicas de microonda (Xu, S. y cols., 2006). Aunque nuestros resultados en hipocampo se han realizado en exposiciones agudas, parece que la estimulación con microonda a dosis atérmicas y de forma aguda también podría intervenir en procesos relacionados con déficits cognitivos. A la vista de estos resultados, sería muy interesante el completar el estudio para valorar con mayor profundidad los efectos de la radiación microonda en el organismo, sobretodo de dosis crónicas de exposición a microonda, dado que constituyen la base de multitud de exposiciones en el día a día incluidos los tratamientos de diatermia en Medicina Física y Rehabilitación.

V.2.-MARCADORES DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA RADIACIÓN NO IONIZANTE: HSP90 Y c-FOS. MÉTODOS DE CÁLCULO DEL SAR.

Para poder llevar a cabo nuestros experimentos resulta imprescindible determinar con la máxima precisión la dosis absorbida de radiación, sobretodo porque al realizar los experimentos con animales pequeños, el peso constituye un factor fundamental en dosimetría (Sebastian Franco, J.L. y cols., 2006). La determinación experimental del SAR puede realizarse de dos maneras fundamentalmente: mediante mediciones termométricas (Moros, E.G. y cols. 1999; Swicord, M. y cols., 1999) o de campo eléctrico y mediante cálculos estimados basados en modelos matemáticos de simulación como el método FDTD (en inglés, Finite Difference Time Domain) (Schönborn, S. y cols., 2004). Dada la importancia de conocer la dosis absorbida y por otro lado dada su complejidad de cálculo debido a la influencia de múltiples factores (Kuster, N. y cols., 2006), hemos aplicado en esta Tesis ambos métodos, por un lado la determinación de medidas de temperatura a través de sondas termométricas rectales, y por otro hemos realizado la

estimación del SAR mediante simulación a través de la técnica FDTD, como hemos descrito anteriormente. En trabajos posteriores llevaremos a cabo estudios comparativos entre estos dos métodos. El cálculo de la dosis absorbida nos va a ayudar a cuantificar los efectos biológicos debidos a la exposición a campos de radiofrecuencia y va a determinar si los efectos biológicos a estudiar se encuentran dentro de rangos térmicos o no térmicos. Nuestros valores de SAR no alcanzan niveles térmicos ya que son inferiores a 0.4W/kg en un ambiente controlado en la totalidad del cuerpo (Martínez A.2004) e inferior a 2W en el cerebro (IEEE 1999).

Debemos tener en cuenta que las mediciones termométricas realizadas con sondas rectales pueden verse influenciadas por los niveles de estrés (Berend Olivier et al 2003), como detectamos en nuestros resultados, ya que a el SAR medio resulta mayor a bajas potencias tras 15 minutos de exposición, probablemente por la influencia del estrés. Pero también debemos considerar la temperatura ambiente (Bratincsák et al 2004), ya que constituye un potencial factor de estrés. En el experimento hemos controlado la temperatura ambiente del compartimento donde se llevó a cabo el experimento, y al no detectar ninguna variación consideramos que este factor no debería de influir en la temperatura de los animales. Esto podría ser de esperar, ya que nuestros valores de SAR se encuentran por debajo de la tasa metabólica basal de estos animales (Moros, E.G., y cols., 1999) y por tanto los mecanismos de termorregulación son capaces de compensar.

El empleo de cámaras experimentales para el estudio de los efectos de la radiofrecuencia en pequeños animales de experimentación permite mantener una exposición controlada de dichos animales, calcular la dosis de SAR y evitar en lo posible interferencias externas. La eficacia de la cámara GTEM que hemos utilizado en nuestro estudio ya ha quedado demostrada en otras publicaciones (Bregains, J.C. y cols., 2008).

Los estudios dosimétricos tienen una gran importancia en experimentación, como reflejan los resultados de esta Tesis, pero también en Medicina Física donde el índice de la energía absorbida de radiación sería necesario precisarlo para mejorar la aplicación de los tratamientos.

Diversos estudios *in vitro* (Lee, S. y cols., 2005) e *in vivo* (Belyaev, I.Y. y cols., 2006) relacionan la exposición a microonda con alteraciones en la expresión de ciertos genes, entre los que se encuentran genes relacionados con el estrés. Sin embargo, estos cambios no siempre han podido ser corroborados (Chauhan, V. y cols., 2006). Los genes inmediatos tempranos como *c-fos* y *c-jun* y los genes del shock térmico constituyen marcadores muy sensibles de estrés metabólico por ello son los marcadores biológicos más empleados para detectar estrés celular (Hossmann, K.A. y Hermann, D.M., 2003). Es por ello, que el empleo de la expresión de marcadores biológicos de actividad neuronal ya ha sido utilizado en una gran variedad de trabajos para investigar el efecto de las microondas, en el sistema nervioso (Morrisey, M.W. y cols., 1999; Whitehead, T.D. y cols., 2005; Finnie, J.W. y cols., 2006; Jorge-Mora, M.T., y cols., 2006; López-Martín, E. y cols., 2008).

Actualmente es bien sabido que el **protooncogen *c-fos***, forma parte de los genes inmediatos tempranos, y que se caracteriza porque su expresión se incrementa de forma rápida y transitoria en respuesta a un estímulo, por ello, se ha empleado como marcador de estrés celular. Se han llevado a cabo multitud de estudios que detectan activación neuronal de *c-Fos* ante diversos tipos de estrés fisiológico y patológico, tanto agudos como crónicos, como los cambios de temperatura (Bachtell, R.K. y cols., 2003), los cambios osmóticos (Kawasaki, M., y cols., 2005), la hipoglucemia, el dolor (Palkovits, M. y cols., 1999; Novikova, N.S., 2004), y el estrés por inmovilización entre otros (Pakác, K. y Palkovits, M., 2001).

La detección inmunohistoquímica de Fos en células neuronales se ha empleado para crear mapas anatómicos funcionales (Sagar, S.M. y cols., 1988; Vendrell, M., y cols., 1998; Yoshida, K. y cols., 2002; Bachtell, R.K. y cols., 2003), así como para estudiar posibles mecanismos de interacción de los CEM no ionizantes con el tejido biológico (Rao y Henderson, 1996), dado que la demostración de marcaje de *c-fos* en las células permite determinar la extensión de la activación neuronal en las estructuras nerviosas (Gaybriel y cols., 1990; LaHoste y cols., 1993; Herrera y cols., 1996). Sin embargo, debemos tener en cuenta que la ausencia de dicho marcaje

no excluye activación neuronal, ya que podría ser que el estímulo aplicado no fuera lo suficientemente intenso como para provocarlo, o que c-fos no se exprese en el tipo neuronal a estudio, o bien que existan otros factores como la ausencia de la activación del segundo mensajero para llegar a expresarse Fos (Pakác, K. y Palkovits, M., 2001; Hoffman, G.E. y Lyo, D., 2002).

El mapeo de Fos en el SNC nos ha permitido observar el comportamiento de las células del SNC frente al estímulo de la microonda a niveles no térmicos. Nuestro estudio demuestra que la exposición a radiación microonda a dosis atérmicas es capaz de estimular la expresión de c-fos en el SNC, y estos resultados coinciden con los de otros investigadores que detectan aumento en la expresión de c-fos en áreas corticales y subcorticales expuestas a radiación microonda a dosis no térmicas (López-Martín, E. y cols., 2009; Morrisey, J.J. y cols.). Otros autores, sin embargo, no han detectado incremento de fos en el SNC tras la exposición a microonda a niveles de dosis igual o por debajo de los límites de exposición recomendados (Morrisey, J.J. y cols., 1999). Como comentamos anteriormente, debemos tener en cuenta que la influencia de otros estímulos, aparte de la microonda, pueda alterar la expresión de este marcador. En nuestro estudio, hemos intentado controlar estímulos como el estrés y la temperatura que pudieran repercutir en los resultados. Se ha controlado las condiciones ambientales donde permanecieron los animales durante el experimento, así como se midió la temperatura rectal antes y después de la exposición. Además, hemos realizado animales control que se han visto sometidos al mismo procedimiento, pero sin recibir radiación, lo cual nos permite reducir la influencia de otros factores como el estrés.

Además, hemos podido comprobar que la expresión de c-fos es dependiente de la potencia y del tiempo de exposición así como de la frecuencia de repetición de dosis. Como observamos en este estudio, los máximos niveles de c-Fos se detectaron tras 90 minutos postexposición, en los animales sometidos a la más alta potencia (12w) y al mayor tiempo de exposición (30 minutos). Este comportamiento farmacocinético con un pico máximo a los 90 minutos coincide

con los valores publicados para esta proteína (Kovács, K.J., 2008). Tras 24h postexposición, los niveles de marcaje son mayores en los animales sometidos a la potencia de 3w y mayor tiempo de exposición, aunque c-fos sigue manteniéndose alto en todos los grupos. Es decir, que a potencias más bajas, la intensidad del estímulo es menor pero se prolonga más tiempo. El efecto retardado o más prolongado en la expresión de c-fos también ha sido detectado en otros estudios, y se ha relacionado con la posibilidad de una activación neuronal secundaria (Cullinan, W.E. y cols., 1995).

En cuanto al marcador hsp90, hemos evaluado los cambios en su expresión a nivel de áreas corticales y subcorticales del cerebro de ratas expuestas a dosis atérmicas de radiación. Hasta el momento, los estudios que han demostrado que hsp90 responde a estímulos de radiación microonda a nivel del SNC son estudios in vitro y a dosis térmicas (Wang, J. y cols., 2006; Tian, F. y cols., 2002), sin embargo no conocemos publicaciones que valoren este marcador en dichas áreas anatómicas a dosis atérmicas de radiación en animales de experimentación. Obtuvimos que a dosis atérmicas de radiación microonda se observan cambios en la expresión de hsp90. El patrón de estimulación de hsp90 frente al estímulo de microonda a 2,45 GHz a dosis atérmicas resulta diferente según el área anatómica, al igual que ocurre con el patrón de calentamiento inducido por otras hsps (Walters, T.J. y cols., 1998). La estimulación de las hsps depende del tipo de estímulo, y de la duración del estímulo (Blake, M.J. y cols., 1990; Garrido, C. y cols., 2001). Se detecta un incremento de hsp90 a nivel de la corteza somatosensorial y de las áreas hipotalámicas, ya a los 90 minutos postexposición, presentando niveles máximos a las 24 horas postexposición. Este incremento resulta más llamativo a la máxima potencia. Estos resultados coinciden con los de otros autores, que también obtienen un pico máximo del marcador hsp a las 24 horas postexposición (Walters, T.J. y cols, 2001). Por otro lado, la expresión se ha visto disminuida en el área hipocampal a las 24 horas postexposición. Dicha

disminución en la estimulación de hsp90, ocurre desde los 90 minutos postexposición sólo a la potencia más alta, lo que reafirma la influencia del factor potencia.

Comparado con la expresión de hsp90 constitutiva en el SNC en condiciones normales, observamos que este patrón se ve modificado ante un estímulo como la microonda. Otros autores también han obtenido que la estimulación del SNC causa cambios en la expresión de múltiples genes (Lee, S. y cols., 2005) y modifica el patrón basal de hsp90 (Jeon, J.S. y cols., 2004). Esta activación podría ser una respuesta que surge de la necesidad de dicha célula de defenderse ante una situación adversa (efecto protector de las hsps) (Tynell, M. y cols., 1993; Latchman, D.S., 2004).

A la vista de estos resultados, parece claro que hsp90 puede resultar útil como marcador de respuesta al estrés de la microonda, y nos ha permitido estudiar la activación metabólica en las células de diversas regiones del SNC de ratas expuestas a dosis atérmicas de radiación microonda. De esta manera, hsp90 podría constituir un marcador de riesgo de daño celular ante el estímulo como la microonda, de manera que niveles altos de hsp90 indicarían protección frente al estrés, mientras que niveles bajos indicarían un fallo en la defensa celular, con el consiguiente riesgo de efectos adversos.

VI. CONCLUSIONES

1. La radiación microonda a 2,45 GHz induce una respuesta de Hsp90 amplia y heterogénea a nivel sistema nervioso central, que podría indicar distintos grados de susceptibilidad anatómica a la interacción con este tipo de radiación no ionizante.
 - a. Por un lado hay un aumento de la expresión de Hsp90 en la corteza somatosensorial y en el hipotálamo.
 - b. La expresión de Hsp90 disminuye en el área del sistema límbico. Este comportamiento podría estar relacionado con factores anatómicos como la localización o la tipología celular así como con circuitos neurofuncionales que resultan activados por dicho estímulo.

2. El patrón de estimulación de Hsp90 antes mencionado se ve afectado por factores relacionados directamente con el estímulo de radiación como la potencia y el tiempo de exposición, e indirectamente con el tiempo después de la exposición, factor que determina el grado de afectación del tejido.
 - a. A nivel de la corteza somatosensorial y del área hipotalámica observamos un estímulo positivo dependiendo de la potencia y el tiempo transcurrido tras la radiación. Con la máxima potencia (12w) se detecta una elevación a 90 minutos en ambas regiones, y también con 1,5 y 3w en el área hipotalámica. Esto nos hace pensar en que la tasa de absorción de energía de radiación es un factor muy importante para desencadenar la síntesis de Hsp90.
 - b. En las regiones de corteza entorrinal e hipocampo pertenecientes ambas al sistema límbico

- i. Se observa un incremento de proteína a los 90 minutos con una posterior disminución de los niveles, al igual que en el hipocampo.
 - ii. La actividad similar de esta proteína en ambas regiones del sistema límbico (corteza entorrinal e hipocampo) nos hace pensar en una vía de propagación común de la radiación que podría desencadenar un defecto en la citoprotección celular.
3. Los resultados que obtuvimos del estudio del marcador de activación neuronal c-fos en el núcleo Paraventricular tras la exposición a microonda a 2,45 GHz nos indican que:
 - a. Este núcleo presenta una importante reactividad al efecto de la microonda con niveles de exposición de SAR no térmico. Esto sugiere que en esta activación podrían estar implicados varios circuitos funcionales simultáneamente.
 - b. La activación del núcleo Paraventricular es dependiente de la potencia de radiación.
 - i. Para exposiciones agudas, de manera que una exposición aguda a 3w resulta insuficiente para llegar a estimular este núcleo, sin embargo la aplicación de potencias de 12 w de forma aguda es suficiente para estimular el núcleo Paraventricular.
 - ii. En exposiciones repetidas el nivel de potencia necesario para desencadenar un incremento de la respuesta del núcleo paraventricular disminuye a 3 w. Esto nos hace pensar que la

habituaación a este estímulo incrementa la activación de las poblaciones neuronales de este núcleo.

- iii. Ambas subpoblaciones celulares del núcleo Pa estudiadas en esta Tesis (PaLM, PaMP+PaV) muestran, en general, un comportamiento parejo en cuanto a su estimulación, excepto la afectación (90 minutos después) y la recuperación (24 horas después) del área parvocelular y ventricular, que es más sensible en este caso.

4. Los resultados obtenidos respecto a los biomarcadores utilizados, indican que Hsp90

- a. constituye un buen marcador anatomofuncional, para estudiar la respuesta del SNC frente a la interacción del tejido biológico con campos de radiofrecuencia.
- b. La detección de la proteína c-fos en el núcleo Paraventricular debido a su intensa respuesta tras estímulos físicos repetidos reflejados en los resultados de esta Tesis puede ser un buen indicador en ensayos experimentales relacionados con terapéutica.

5. Nuestros experimentos fueron realizados a niveles de SAR no térmico, por lo que no es posible descartar la existencia de efectos de naturaleza no térmica derivados de la interacción de la radiofrecuencia en tejido cerebral in vivo. Esto nos anima a seguir investigando en esta dirección, ampliando nuestras investigaciones sobre aplicaciones terapéuticas de la radiación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adair, E.R., Adams, B.W., Akel, G.M. (1984) Minimal changes in hypothalamic temperature accompany microwave-induced alteration of thermoregulatory behavior. Bioelectromagnetics, 5(1):13-30.
- Adair, E.R., Adams, B.W., Kelleher, S.A., Streett, J.W. (1997) Thermoregulatory responses of febrile monkeys during microwave exposure. Annals New York Academy of Sciences, 813:497-507.
- Adair, E.R., Black, D.R. (2003) Thermoregulatory responses to RF energy absorption. Bioelectromagnetics, 24(Suppl 6):S17-S38.
- Adair, R.K. (2003). Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation. Bioelectromagnetics, 24(1):39-48.
- Adori, C, Andó, R.D, Kovács, G.G, Bagdy, G. (2006). Damage of serotonergic axons and immunolocalization of Hsp-27, Hsp72, and Hsp90 molecular chaperones after a single dose of MDMA administration in Dar Agouti rat: Temporal, spatial, and cellular patterns. The Journal of Comparative Neurology, 497 (2): 251-269.
- Aguilar Gutiérrez, M. (2001). Campos eléctricos y magnéticos y seres vivos. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Colección de textos universitarios, nº 32. Madrid. ISBN: 84-00-07928-0.
- Amaral, D.G., Witter, M.P. (1994). Hippocampal Formation. In : *The Rat Nervous System*, second edition, G. Paxinos, Ed, pp. 443-494. San Diego Academic.
- Amin, V., Cumming, V.E., Coffin, R.S., Latchman, D.S. (1995). The degree of protection provided to neuronal cells by a pre-conditioning stress correlates with the amount of heat shock protein 70 it induces and not with the similitary of the subsequent stress. Neuroscience Letters, 200: 85-88.
- Ammari, M., Lecomte, A., Sakly, M., Abdelmelek, H., de-Seze, R. (2008). Exposure to GSM 900 MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity. Toxicology, 250:70-74.
- Antonio, C., Deam, R.T. (2007). Can “microwave effects” be explained by enhanced diffusion?. Physical Chemistry Chemical Physics, 9: 2976-2982.
- Bachtell, R.K., Tsivkovskaia, N.O., Ryabinin, A.E. (2003) Identification of temperature-sensitive neural circuits in mice using c-Fos expression mapping. Brain Research, 96: 157-164.
- Bae, D.D., Brow, P.L., Kiyatkin, E.A. (2007). Procedure of rectal temperature measurement affects brain, muscle, skin and body temperatures and modulates the effects of intravenous cocaine. Brain Research, 1154:61-70
- Balklavadzhyan, O.G. (1983). Central mechanism of homeostasis, Specific Physiology of the Nervous System (in Russian), Nauka, Leningrad.
- Banik, S.; Bandyopadhyay, S.; Ganguly, S. (2003). Bioeffects of microwaves—a brief review. Bioresource Technology. 87(2): 155-159.

- Batulan, Z., Nalbantoglu, J., Durham, D. (2005) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially affect the heat shock response in cultured spinal cord cells. Cell Stress & Chaperones, 10 (3): 185-196.
- Batulan, Z., Taylor, D.M., Aarons, R.J., Minotti, S., Doroudchi, M.M., Nalbantoglu, J., Durham, H.D. (2006). Induction of multiple heat shock proteins and neuroprotection in a primary culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis Neurobiol Dis., 24(2):213-25.
- Beason, R.C., Semm, P. (2002). Responses of neurons to an amplitude modulated microwave stimulus. Neurosci Lett, 333:175-178.
- Bechtold, D.A., Brown, I.R. (2003). Induction of Hsp27 and Hsp32 stress proteins and vimentin in glial cells of the rat hippocampus following hyperthermia. Neurochemical Research, 28 (8):1163-1174.
- Belyaev, I.Y., Koch, C.B., Terenius, O., Roxström-Lindquist, K., Malmgren, L.O.H., Sommer, W.H., Salford, L.G., Persson, B.R.R. (2006) Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation. Bioelectromagnetics, 27(4):295-306.
- Benarroch, E.E. (2007). Thermoregulation. Recent concepts and remaining questions. Neurology, 69 (18): 1293-97.
- Bharadwaj, S., Ali, A., Ovsenek, N. (1999). Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. Mol Cell Biol. (12):8033-41.
- Bicego, K.C., Barros, R.C.H., Branco, L.G.S. (2007). Physiology of temperatura regulation: comparative aspects. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 147:616-639.
- Bilkei-Gorzo, A., Racz, I., Michel, K., Mauer, D., Zimmer, A., Klingmüller, D., Zimmer, A. (2008). Control of hormonal stress reactivity by the endogenous opioid system. Psychoneuroendocrinology, May;33(4):425-36
- Blake, M.J.; Nowak, T.S., Holbrook, N.J. (1990). In vivo hyperthermia induces expression of hsp70 mRNA in brain regions controlling the neuroendocrine response to stress. Mol. Brain. Res., 8: 89-92.
- Booth, D.W.; Westers, B.M. (1989). The management of athletes with myositis ossificans traumatica. Can J Sports Sci., 14: 10-16.
- Boulant, J.A.; Demieville, H.N. (1977) .Response of thermosensitive preoptic and septal neurons to hippocampal and brain stem stimulation. Journal of Neurophysiology, 40(6): 1356-1368.
- Boullant, J.A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. Clinical infections diseases.;31: S157-61.
- Bouwknicht, A., Veening, J., Vander Gugten, J., Groenink, L. (2003). Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. European Journal of Pharmacology, 463:117-132.

- Bratincsák, A., Palkovits, M. (2004). Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. Neuroscience, 127(2):385-97.
- Bregains, J.C. López-Martín, E., Jorge-Barreiro, F.J., Sebastián-Franco, J.L., Moreno-Piquero, E. Arespina, F.J. (2008). Estudio de los efectos de la radiación en el cerebro de ratas expuestas en una cavidad GTEM a 900 y 1800 MHz. XXIII Simposium Nacional de la Union Científica Internacional de Radio (URSI).
- Brillaud, E., Piotrowski, A., De Seze, R. (2007). Effects of an acute 900 MHz GSM exposure on glia in the rat brain: A time-dependent study. Toxicology, 238: 23-33.
- Briski, K., Gillen, E. (2001). Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. Psychological stress. Brain Research Bulletin, 55: 401-408.
- Brown, M.A., Zhu, L., Schmidt, C., Tucker, P. (2007). Hsp90- from signal transduction to cell transformation. Bioche Biophy Res Commun, 363(2): 241-246.
- Bullitt, E. (1990). Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. Journal of Comparative of Neurology, 296 (4): 517-30.
- Busljeta, I., Trosic, I., Milkovic-Krause, S. (2004). Erythropoietic changes in rats after 2.45 GHz nonthermal irradiation. Int J. Hyg Environ Health, 207(6), 549-54.
- Cajal, S.R. (1911). *Histologie du système nerveux*. Maloine. Paris.
- Callahan, M.K., Garg, M., Srivastava, P.K. (2008). Heat-shock protein 90 associates with N-terminal extended peptides and is required for direct and indirect antigen presentation. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(5):1662-7.
- Caraglia, M., Marra, M., Mancinelli, F., D'Ambrosio, G., Massa, R., Giordano, A., Budillon, A., Abbruzzese, A., Bismuto, E. (2005). Electromagnetic field at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of multi-chaperone complex in human epidermid cancer cells. Journal of Cellular Physiology, 204; 539-548.
- Cenci, M.A., Tranberg, A., Andersson, M., Hilbertson, A. (1999). Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-dopa treatment. Neuroscience, 94(2):515-27.
- Challis, L.J. (2005). Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissues. Bioelectromagnetics supplement 7: S98-S106.
- Cham, J.L., Badoer, E. (2001). Exposure to a hot environment can activate rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus in consciencious rats. Exp. Physiol. 93.1: 64-74.
- Cham, J.L., Badoer, E. (2007). Exposure to a hot environment can activate spinally projecting and nitergic neurones in the lower brainstem in the rat. Exp Physiol, 92(3):529-40.

- Chauhan, V., Mariampillai, A., Gajda, G.B., Thansandote, A., McNamee, J.P. (2006). Analysis of proto-oncogene and heat-shock protein gene expression in human derived cell-lines exposed in vitro to an intermittent 1.9 GHz pulse-modulated radiofrequency field. Int J Radiat Biol., 82(5):347-54.
- Chen, S., Brown, I.R. (2007). Neuronal expression of constitutive heat shock proteins: implications for neurodegenerative disorders. Cell Stress &Chaperones 12(1), 51-58.
- Chiral, M., Grongnet, J.F., Plumier, J.C., David, J.C. (2004). Effects of hypoxia on stress proteins in the piglet brain at birth. Pediatric Research.56 (5), 775-82
- Chiu, R., Boyle, W., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., Karin, M. (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. Cell, 54, 541-552.
- Choi, Y.K., Jo, P.G., Choi, C.Y. (2008). Cadmium affects the expression of heat shock protein 90 and metallothionein mRNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 147: 286-292.
- Cintra, A., Zoli, M., Rosén, L., Agnati, L.F., Okret, S., Wikström, A.C., Gustaffsson, J.A., Fuxe, K. (1994). Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. Neuroscience. 62(3):843-97.
- Cirelli, C., Tononi, G. (2000). On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. Sleep, 23(4): 453-465.
- Cóndes-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Martínez-Lorenzana, G., Rodríguez-Jiménez, J., López-Hidalgo, M., Freund- Mercier, M.J. (2006). Paraventricular hypothalamic influences on spinal nociceptive processing. Brain Research, 1081: 126-37.
- Cosquer, B., Pereira de Vasconcelos, A., Fröhlich, J., Cassel, J.C. (2005). Blood-brain barrier and electromagnetic fields: effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2.45 GHz microwaves rats. Behavioural Brain Research, 161(2):229-37.
- Coss, R.A. (2005). Inhibiting induction of heat shock proteins as a strategy to enhance cancer therapy. International Journal of Hyperthermia., 21 (8), 695-701.
- Coveñas, R., de León, M., Cintra, A., Bjelke, B., Gustafsson, J.A., Fuxe, K. (1993). Coexistence of c-Fos and glucocorticoid receptor immunoreactivities in the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat after acute immobilization stress. Neurosci Lett., 149(2):149-52.
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., Watson, S.J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience.,64(2):477-505.

- D'Souza, S.M., Brown, I.A. (1998). Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70, and Hsp60 in neuronal and non-neuronal tissues of rat during postnatal development. Cell Stress & Chaperones, 3(3): 188-189.
- D'Andrea, J.A. (1999). Behavioral evaluation of microwave radiation. Bioelectromagnetics. Supplement 4: S64-S74.
- D'Andrea, J.A., Chou, C.K., Johnston, S.A., Adair, E.R. (2003) .Microwave effects on the nervous system. Bioelectromagnetics. Supplement 6:S107-S147.
- D'Andrea, J.A., Ziriach, J.M., Adair, E.R. (2007). Radio frequency electromagnetic fields: mild hyperthermia and safety standars. Progress in Brain Research, 162:107-135.
- Dawe, A.S., Smith, B., Thomas, D.W.P., Greedy, S., Vasic, N., Gregory, A., Loader, B. De Pomerai, D. (2006). A small temperature rise may contribute towards the apparent induction by microwaves of heat shock gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Bioelectromagnetics, 27:88-97.
- De Pomerai, B., Smith, A., Dawe, K., North, T., Smith, D., Archer, I., Duce, D., Jones, E., Candido. (2003). Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. FEBS Letters, 543 (1-3): 93 - 97.
- DelloRusso, C., Polak, P., Mercado, P., Spagnolo, A., Sharp, A., Murphy, P., Kalman, A., Burrows, J., Fritz, L., Feinstein, L. (2006). The heat-shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin suppresses glial inflammatory responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of Neurochemistry, 99,1351-1362.
- Devaney, E. (2006). Thermoregulation in the life cycle of nematodes. International Journal of Parasitology, 36(6): 641-649.
- Dewhirst, M.W., Vigliant, B.L., Lora-Michiels, M., Hanson, M., Hoopes, P.J. (2003). Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. International Journal of Hyperthermia. 19 (3): 267-294.
- Di Carlo, A., White, N., Guo, F., Garrett, P., Litovitz, T. (2002). Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection. J Cell Biochem, 84(3):447-54.
- Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., Garrido, C. (2006). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Handb Exp Pharmacol, 172, 171-98.
- Djeridane, Y., Touitou, Y., de Seze, R. (2008). Influence of electromagnetic fields emitted by GSM-900 cellular telephones on the circadian patterns of gonadal, adrenal and pituitary hormones in men. Radiat Res, 169(3):337-43.
- Fadilah, R., Pinkas, J., Weinberger, A., Lev, A. Heating rabbit joint by microwave applicator.(1987). Archives of Physical Medicine and Rehabilitation;68(10):710-2.
- Finnie, J.W. (2005) Expression of the immediate early gene, c-fos, in mouse brain after acute global system for mobile communication microwave exposure. Pathology; 37(3):231-3.

- Finnie, J.W., Cai, Z., Blumbergs, P.C., Manavis, J., Kuchel, T.R. (2006). Expression of the immediate early gene, c-fos, in fetal brain after whole of gestation exposure of pregnant mice to global system for mobile communication microwaves. Pathology 38(4): 333-335.
- Floyd, R.A. (1999). Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Proc Soc Exp Biol Med. 222(3):236-45.
- Franke, H.; Ringelstein, E.B.; Stögbauer, F. (2005). Electromagnetic fields (GSM 1800) do not alter blood-brain barrier permeability to sucrose in models in vitro with high barrier tightness. Bioelectromagnetics, 26: 529-535.
- French, P.W., Penny, R., Laurence, J.A., McKenzie, D.R. (2001). Mobile phones, heat shock proteins and cancer. Differentiation. 67(4-5):93-7.
- Fritze, K., Sommer, C., Schmitz, B., Mies, G., Hossmann, K.A., Kiessling, M., Wiessner, C. (1997a). Effects of global system for mobile communication (GSM) microwave exposure on blood-brain barrier permeability in rat. Acta Neuropathol 94: 465-470.
- Fritze, K., Wiessner, C., Kuster, N., Sommer, C., Gass, P., Hermann, D.M., Kiessling, M., Hossmann, K.A. (1997b). Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain, Neuroscience; 81 (3): 627-63.
- Furay, A.M., Murphy, E.K., Mattson, M.P., Guo, Z., Herman, J.P. (2006). Region-specific regulation of glucocorticoid receptor/HSP90 expression and interaction in brain. Journal of Neurochemistry, 98(4), 1176-1184.
- Garnier, C., Barbier, P., Gilli, R., Lopez, C., Peyrot, V., Briand, C. (1998) Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. Biochem Biophys Res Commun. 250(2):414-9.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G. (2001). Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochemical and Biophysical research Communications, 286,433-442.
- Garrity, P.A., Chen, D., Rothenberg, E.V., Wold, B.J. (1994). Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding both constitutive and regulated factors. Molecular Biology, 14, 2159-2169.
- Gass, P., Schroder, H., Prior, P., Kiessling, M. (1994). Constitutive expression of heat shock protein 90 (HSP90) in neurons of the rat brain. Neurosci.Lett., 182(2):188-192.
- Giombini, A., Giovannini, V., Di Cesare, A., Pacetti, P., Ichinoseki-Sekine, N., Shiraisi, M., Naito, H., Maffulli, N. (2007). Hyperthermia induced by microwave diathermy in the management of muscle and tendon injuries. British Medical Bulletin, 83: 379-96.
- Goats, G.C. (1990). Microwave diathermy. Br.J.Sp.Med.,24(4); 212-18.
- Grad, I., Picard, D. (2007). The glucocorticoid response are shaped by molecular chaperones. Molecular and Cellular Endocrinology, 275: 2-12.

- Grafström, G., Nittby, H., Brun, A., Malmgren, J., Persson, B., Leif G. Salford, L.G., Eberhardt, J. (2008). Histopathological examinations of rat brains after long-term exposure to GSM-900 mobile phone radiation. Brain Research Bulletin 77: 257-263.
- Graybiel, A.M, Moratalla, R., Robertson, H.A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. Proc Natl Acad Sci U S A, 87:6912–6916.
- Guy, A.W., Lehmann, J.F., Stonebridge, J.B. (1974). Therapeutic applications of electromagnetic power. Proceedings of the IEEE. 62(1):55-75.
- Hamblin, D.L., Wood, A.W. (2002). Effects of mobile phone emissions on human brain activity and sleep variables. Int. J Radiat Biol., 78:659-669.
- Harman, D. (2006) .Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. Ann N Y Acad Sci., 1067:454-60. Review.
- Harvey, C., French, P.W. (1999). Effects on protein kinase C and gene expression in a human mast cell line, HMC-1, following microwave exposure. Cell Biology International. 23: 739-748.
- Heads, R.J., Yellon, D.M., Latchman, D.S. (1995). Differential cytoprotection against heat stress or hypoxia following expression of specific stress protein genes in myogenic cells. J. Mol. Cell. Card., 27(8):1669-78.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., Ziegler, D.R., Tasker, J.G. (2002). Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. European Journal of Neuroscience, 16: 381-385.
- Herman, J.P., Cullinan, W.P. (1997). Neurocircuitry of stress: central control of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neuroscience, 29, 78-84.
- Herrera, D.G., Robertson, H.A. (1996). Activation of c-fos in the brain. Prog Neurobiol 50:83–107.
- Hinrikus, H., Bachmann, M., Lass, J., Karai, D., Tuulik, V. (2008a). Effect of low frequency modulated microwave exposure on human EEG: individual sensitivity. Bioelectromagnetics, 29(7): 527-38.
- Hinrikus, H., Bachmann, M., Lass, J., Tomson, R., Tuulik, V. (2008b). Effects of 7, 14, and 21 Hz modulated 450 MHz microwave radiation on human electroencephalographic rhythms. International Journal of Radiation Biology, 84(1): 69-79. (2).
- Huang, H., Lee, W.C., Lin, J.H., Jian, S.C., Mao, S.J., Yang, P.C., Huang, T.Y., Liu, Y.C. (1999). Molecular cloning and characterization of porcine cDNA encoding a 90-kDa heat shock protein and its expression following hyperthermia. Gene, 26(2).307-15.
- Huang, T.Q., Lee, M.S., Oh, E.H., Kalinec, F., Zhang, B.T., Seo, J.S., Park, W.Y. (2008). Characterization of biological effect of 1763 MHz radiofrequency exposure on auditory hair cells. Int J Radiat Biol. 84(11):909-15.
- Hyland, G.J. (2000). Physics and biology of mobile telephony. Lancet. 25;356(9244):1833-6.

- ICNIRP. (1998). "International comisión on non-ionizing radiation protection". Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up 300GHz). Health Physics 74:494-520.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Demura, H. (1995). Regulation of gene expression in the central nervous system by stress: Molecular pathways of stress responses. Endocrin. J.,42: 2121-130.
- Imaki, T., Vale, W., Sawchenko, P.E.(1992). Regulation of corticotropin-releasing factor mRNA in neuroendocrine and autonomic neurons by osmotic stimulation and volume loading. Neuroendocrinology. 56(5):633-40.
- Inaba, R., Shishido, K., Okada, A., Moroji, T. (1992). Effects of whole body microwave exposure on the rat brain contents of biogenic amines. Eur J. Appl. Physiol. Occup. Physiol., 65(2):124-8.
- Institute of Electrical and Electronics Engineers. (1999). IEEE Standard for safety levels with respect to human exposure to radofrequency electromagnetic fields, 3kHz to 300GHz IEEE C95.1-1999. Piscataway, NJ.
- Itoh, H., Tashima, Y., Eishi, Y., Okeda, R. (1993). Localization of HSP90 in rat brain. Int J Biochem.25(1):93-9.
- Izumoto, S., Herbert, J. (1993). Widespread constitutive expression of HSP-90 messenger RNA in rat brain. J. Neurosci. Res. 35:20-28.
- Jankord, R., Herman, J.P. (2008). Limbic regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Function during acute and chronic stress. Steess, neurotransmitters, and hormones: Ann.N. Y. Acad.Sci., 1148:63-73.
- Jeon, S.G , Sang Wook Park, Dong Woon Kim, Je Hoon Seo, Jaeyoung Cho, So Young Lim, Seong Deok Kim (2004). Glial expression of the 90-kDa heat shock protein (HSP-90) and the 94-kDa Glucose-regulated protein (GRP94) following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. Glia,48: 250-258
- Jessen, C. (2001). Temperature regulation in humans and other mammals. Ed. Springer. Heidelberg, Alemania. ISBN: 35400412344.
- Jhonson, A.K., Thunhorst, R.L. (1997) .The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanism of central integration, Front Neuroendocrinology,18: 292-353.
- Joëls, M. (2001). Corticosteroid actions in the hippocampus. J Neuroendocrinol,13(8):657-69.
- Joëls, M., Karst, H., Krugers, H.J., Lucassen, P.J. (2007). Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. Frontiers in Neuroendocrinology 28: 72–96
- Jorge–Mora, M. J. Misa–Agustiño, J. C. Brégains, F. J. Ares–Pena, F. J. Jorge–Barreiro, E. López–Martín. 2006. Microwave exposure of rats to thermal and non–thermal 2.45 GHz radiation produces changes in neuronal expression of heat shock protein (HSP–90).

Proceedings of Biological Effects of Electromagnetic Fields, EMF.(2) 1030-1034.ISBN: 960-233-173-9008.

Joubert, V., Bourthoumieu, S., Leveque, P., Yardin, C. Rad. (2008) Apoptosis is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons. Rad. Res. 169(1):38-45.

Karabakhtsian, R. Broude, N., Shalts, N. Kochlatyi, S. Goodman, R., Henderson, A.S. (1994).Calcium is necessary in the cell response to EM fields. FEBS letters 149: 1-6.

Katchinski, D.M. (2004). On heat and cells and proteins. New Physiol Sci., 19: 11-15.

Kawagoe, J., Abe, K., Aoki, M., Kogore, K. (1993) Induction of HSP-90 α heat shock mRNA after transient global ischemia in gerbil hippocampus Brain Research.,621:121-125.

Kawagoe, J., Abe, K., Aoki, M., Kogore, K. (1993).Induction of HSP-90 α heat shock mRNA after transient global ischemia in gerbil hippocampus Brain Research.621:121-125.

Khan, E. An examination of the blood-brain barrier in health and disease. (2005). Br. J. Nurs. 14, 509-513.

Khan, M.G., Konde, E., Dossou, F., Labaree, D.C., Hochberg, R.B., Hoyte, R.M. (2006).Microwave-enhanced nucleophilic fluorination in the synthesis of fluoropyridyl derivatives of [3, 2-c] pyrazolo-corticosteroids, potential glucocorticoid receptor-mediated imaging agents. Bioorg Med Chem Lett. 1;16 (13):3454-8.

Kononen, J., Honkaniemi, J., Alho, H., Koistinaho, J., Iaradola, M., Pelto-Huikko, M. (1992). Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress. Endocrinology.130:3041-3047.

Konsman, J.P., Veeneman, J., Combe, C., Poole, S., Luheshi, G.N., Dantzer, R. (2008). Central nervous action of interleukin-1 mediates activation of limbic structures and behavioural depression in response to peripheral administration of bacterial lipopolysaccharide. Eur J Neurosci. Dec;28(12):2499-510.

Kovacs, K. (1998).c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. Neurochem Int. 33, 287-297.

Kovács, K.J. (2008). Measurement of immediate-early gene activation c-fos and beyond. Journal of Neuroendocrinology, 20, 665-672.

Kuo, Y-C. (2008). Electromagnetic interference in the permeability saquinavir across the blood-brain barrier using nanoparticulate carriers. International Journals of Pharmaceutics,351 (1-2):271-281,

Kuribayashi, M., Wang, J., Fujiwara, O., Doi, Y., Nabae, K., Tamano, S., Ogiso, T., Asamoto, M., Shirai, T. (2005). Lack of effects of 1439 MHz electromagnetic near field exposure on the blood-brain barrier in immature and young rats. Bioelectromagnetics. Oct;26 (7):578-88.

- Kuster, N., Berdiñas-Torres, V., Nikoloski, N., Frauscher, M., Kainz, W. (2006). Methodology of detailed dosimetry and treatment of uncertainty and variations for in vivo studies. Bioelectromagnetics, 27:378-391.
- Kwee, S. (2006). Absence of linear correlation between biological effects and power density in the non-thermal radiofrequency radiation range. Biological Effects of EMFs. 4th International Workshop. Vol. 1, 401-406.
- LaHoste, J., Yu, J., Marshall, J.F. (1993). Striatal fos expression is indicative of dopamine D1/D2 synergism and receptor supersensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A 90:7451-7455.
- Lai, H., Carino, M.A., Horita, A., Guy, A.W. (1989). Low level microwave irradiation and central cholinergic systems Pharmacology Biochemistry and Behavior.33, 131-138.
- Lai, H., Carino, M.A., Wen, Y.F., Horita, A., Guy, A.W. (1991). Naltrexone pretreatment blocks microwave-induced changes in central cholinergic receptors. Bioelectromagnetics, 12(1):27-33.
- Latchman, D.S. (2004). Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. Current Neurovascular Research, 1: 21-27.
- Laurence, J.A., French, P.W., Lindner, R.A., McKenzie, D.R. (2000) .Biological effects of electromagnetic fields-mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. J. Theor. Biol. 206: 291-298.
- Lebedeba, N.N. (1998). Reactions of the human central nervous system to electromagnetic fields with different biotropic parameters. Biomeditsinskaya Radioelektronika. 1: 24-36
- Lechmann, J.F. (1953).The biophysical basis of biologic ultrasonic reactions with special reference to ultrasonic therapy. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 34: 139-152.
- Lechmann, J.F., Masock, A.J., Warren, C.G., Klobanski, J.R. (1970).Effect of therapeutic temperatures on tendon extensibility. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 51: 481-487.
- Lee S, Jhonson D, Dubar K, Dong H, Ge X, Kim CY, Wing C, Jayathilaka N, Emmanuel N, Zhou CQ, Gerber HL, Tseng CC, Wang SM.(2005). 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. FEBS letters. 579. 4829-4836.
- Lee,S., Johnson, D., Dunbar, K., Dong, H., Ge, X., Kim, Y.C., Wing, C., Jayathilaka, N., Emmanuel,N., Zhou,C.Q., Gerber, H.L., Tseng, C.C., Wang, S.M. (2005).2.45GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. FEBS Letters 579(21) 4829-4836.
- Lehmann, J., de Lateur, B. Therapeutic heat. Int. J. F. Lehmann (ed.), Therapeutic heat and cold, pp.404-562. Baltimore:Williams and Wilkins.
- Lehmann, J.F., de Lateur, B.J. Capítulo 13. Diatermia y terapéutica superficial con calor, láser y frío. Krusen. Medicina física y rehabilitación.Kottke, F.J., Lehmann, J.F. Editorial médica panamericana. Madrid, 1993. ISBN: 84-7903-162-X.

- Lehmann, J.F., Dundore, D.E., Esselman, P.C., Nelp, W.B. (1993). Microwave diathermy: effects on experimental muscle hematoma. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. 64(3): 127-9.
- Lehmann, J.F., Masock, A.J., Warren, C.G., Klobanski, J.N. (1970). Effect of therapeutic temperatures on tendon extensibility. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation ; 51: 481-487.
- Leszczynski, D., Joenväärä, S., Reivinen, J., Kuokka, R. (2002). Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer and blood-brain barrier-related effects. Differentiation 70: 120-129.
- Li, M., Wang, Y., Zhang, Y., Zhou, Z., Yu, Z. (2008) Elevation of plasma corticosterone levels and hippocampal glucocorticoid receptor translocation in rats: a potential mechanism for cognition impairment following chronic low-power-density microwave exposure. J Radiat Res., 49(2):163-70.
- Lin J.C. (2003). Cellular telephone radiation and electroencephalograms (EEG) of the human brain. IEEE Antennas and Propagation Magazine, 45 (5)150-153.
- Lin, J.C., Yuan, P.M.K., Jung, D.T. (1998). Enhancement of anticancer drug delivery to the brain by microwave induced hyperthermia. Bioelectrochem Bioenergetics. 47:259-264.
- Liu, D.H., Yuan, H.Y., Cao, C.Y., Gao, Z.P., Zhu, B.Y., Huang, H.L., Liao, D.F. (2007) Heat shock protein 90 acts as a molecular chaperone in late-phase activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 stimulated by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. Acta Pharmacol Sin. 28(12):1907-13.
- Liu, J., Garza, J.C., Truong, H.V., Henschel, J., Zhang, W., Lu, X.Y. (2007) The melanocortinergic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior. Endocrinology. Nov; 148(11):5531-40.
- Lixa, S., Yao, K., Kaijun, W., Deqiang, L., Huajun, H., Xiannwei, G., Baohong, W., Wei, Z., Jianling, L., Wei, W. (2006). Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutat Res. 602 (1-2), 135-42.
- Loones, M.T., Chang, Y.H. and Morange, M. (2000). The distribution of heat shock proteins in the nervous system of the unstressed mouse embryo suggest a role in neuronal and non neuronal differentiation. Cell Stress & Chaperones 5(4):291-305.
- Lopez-Martín, E., Bregains, J., Relova-Quinteiro, J.L., Cadarso-Suarez, C., Jorge-Barreiro, F.J., Ares-Pena, F.J. (2009). The action of pulse-modulated GSM radiation increases regional changes in brain activity and c-Fos expression in cortical and subcortical areas in a rat model of picrotoxin-induced seizure proneness. Journal of Neuroscience Research. In press.
- Lopez-Martín, E., Bregains, J.C., Jorge-Barreiro, F.J., Sebastian-Franco, J.L., Moreno-Piquero, E., Ares-Pena, F. (2008). Set-up for measurement of the power absorbed from 90MHz GSM standing waves by small animals, illustrated by application to picrotoxin-treated rats. Progress In Electromagnetics Research, PIER 87, 149–165,

- López-Martín, E., Relova-Quinteiro, J.L., Gallego-Gómez, R., Peleteiro-Fernández, M., Jorge-Barreiro, F.J., Ares-Pena, F.J. (2006). GSM radiation triggers seizures and increases cerebral c-Fos positivity in rats pretreated with subconvulsive doses of picrotoxin. Neurosci Lett. 1; 398(1-2):139-144.
- Lorente de No, R. (1934). Studies on the structure of the cerebral cortex. J. Psychol. Neurol (Leipzig). 46, 113 – 177.
- Mailhos, C., Howard, M.K., Latchman, D.S. (1993). Heat shock protects neuronal cells from programmed cell death by apoptosis. Neuroscience, 55(3): 621-627.
- Makino, S., Tanaka, Y., Nazarloo, H.P., Noguchi, T., Nishimura, K., Hashimoto, K. (2005). Expression of type 1 corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus following restraint stress in CRH-deficient mice. Brain Res. 1048(1-2):131-7
- Mancinelli F, Caraglia M, Abbruzzese A, d'Ambrosio G, Massa R, Bismuto.(2004). Non-thermal effects of electromagnetic fields at mobile phone frequency on the refolding of an intracellular protein: myoglobin. Cell Biochem.; 93(1):188-96.
- Marshall, I., Karaszewski, B., Wardlaw, J.M., Cvorovic, V., Wartolowska, K., Armitage, P.A., Carpenter, T., Bastin, M.E., Farrall, A., Haga, K. (2006). Measurement of regional brain temperature using proton spectroscopic imaging: validation and application to acute ischemic stroke. Magnetic Resonance Imaging 24: 699-706.
- Martínez A. (2004). Tesis doctoral: Estudio y desarrollo de técnicas de evaluación de dosimetría electromagnética y de niveles de exposición a emisiones radioléctricas.
- Martínez-Lorenzana, G., Espinosa-López, L., Carranza, M., Aramburo, C., Paz-Tres, C., Rojas-Piloni, G., Cónides-Lara, M. (2009). PNV electrical stimulation prolongs withdrawal latencies and releases oxytocin in cerebrospinal fluid, plasma, and spinal cord tissue intact and neuropathic rats. Pain 140: 265-273.
- Martínez-Morillo, M.; Pastor-Vega, J.M.; Sendra-Portero, F. (1998). Manual de Medicina Física. Harcourt Brace Publishers International. División Iberoamericana. ISBN: 84-8174-183-3.
- Mason, P.A., Escarciga, R., Doyle, J.M., Romano, W.F., Berger, R.E., Donnellan.(1997). Amino Acid in hypothalamic and caudate nuclei during microwave-induced thermal stress: Analysis by microdialysis. Bioelectromagnetics. 18:277-283.
- Massa, S.M., Swanson, R.A., Sharp, F.R. (1996). The stress gene response in the brain. Cerebrovascular Brain metabolism Rev.; 8:95-158.
- Masuda, H., Ushiyama, A., Hirota, S., Wake, K., Watanabe, S., Yamanaka, Y., Taki, M., Ohkubo, C. (2007). Effects of subchronic exposure to a 1439 MHz electromagnetic field on the microcirculatory parameters in rat brain. In Vivo. 21(4):563-70.
- McAllen, R.M. (2004). Preoptic thermoregulatory mechanisms in detail. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 287: R272-273.

- Mckinley, M.J., Hards, D.K., Oldfield, B.J. (1994). Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunochemistry and neural tracing, Brain research, 653(1-2): 305-14.
- Mickley, G.A., Cobb, B.L., Mason, P.A., Farell, S. (1994). Disruption of putative working memory-task and selective expression of brain c-fos following microwave-induced hyperthermia. Physiological Behavior 55: 1029-1038.
- Millar, N.I., Wei, A.Q., Molloy, T.J., Bonar, F., Murrell, G.A.C. (2008). Heat shock protein and apoptosis in supraespinosus tendinopathy. Clin Orthop Relat Res., 466:1569-1576.
- Minasyan, S.M., Grigoryan, G.Y., Saakyan, S.G., Akhmyan, A.A., Kalantaryan, V.P. (2007). Effects of the action of microwave-frequency electromagnetic radiation on the spike activity of neurons in the supraoptic nucleus of the hypothalamus in rats. Neuroscience and Behavioral Physiology,37(2):175-80.
- Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora, M.T., Brégains,J.C., Ares-Pena, F., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (2006). Exposure of rat thyroid gland to 2450 MHz microwave induces changes in expression of HSP-90. Proceedings of Biological Effects of Electromagnetic Fields, EMF.(2) 1030-1034 ISBN: 960-233-173-9008.
- Miyata, Y., Yahara, I. (1991). Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. J Biol Chem,266(14):8779-83.
- Moros, E.G., Traube, W.L., Pickard, W.F. (1999). Compact shielded exposure system for the simultaneous long-term UHF irradiation of forty small mammals. II. Dosimetry. Bioelectromagnetics, 20: 81-93.
- Morrison, S.F., Nakamura, K., Madden, C.J. (2008).Central control of thermogenesis in mammals. Experimental Physiology. 93;7:773-797.
- Morrissey, R.W., Raney, S., Heasley, E., Rathinavelu, P., Dauphinee, M., Fallon, J.H. (1999). Iridium exposure increases c-fos expression in the mouse brain only at levels which likely result in tissue heating. Neuroscience, 92:1539–1546.
- Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr Rev. 5(1):25-44.
- Neubauer, C., Phelan, A.M., Kues, H., Lange, D.G. (1990). Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex. Bioelectromagnetics, 11(4): 261-8.
- Niimi, M., Sato, M., Tamaki, Y., Wada, Y., Takahara, J., Kawanishi, K. (1995). Induction of fos protein in the rat hypothalamus elicited by insulin-induced hypoglycemia. Neurosci Research, 23:361-364.
- Nittby, H., Grafström, G., Tian, D.P., Malmgren, L., Brun, A., Persson, B.R., Salford, L.G., Eberhardt, J. (2008). Cognitive impairment in rats after long-term exposure to GSM-900 mobile phone radiation. Bioelectromagnetics, 29(3):219-32.

- Novikova, N.S., Kazakova, T.B., Rogers, V., Korneva, E.A. Expression of the c-fos gene in spinal cord and brain cells in rats subjected in conditions of exposure to various types of halothane anesthesia. Neuroscience and behavioural Physiology, 34(4), 2004. Pp: 407-412.
- Novikova, N.S., Kazakova, T.B., Rogers, V., Korneva, E.A.(2004).Expression of c-fos gene in cells of spinal cord and brain in conditions of stress during use of various types of halothane anesthesia. Ros fiziol.Zh.im.I.M. Sechenova, 88(11): 1378-1387.
- Novikova, N.S., Kazakova, T.B., Rogers, V.J., Korneva, E.A. (2002). C-fos gene expression induced in cells in specific hypothalamic structures by noxious mechanical stimulation and its modification by exposure of the skin to extremely high frequency irradiation. Neuroendocrinology Letter, 23(4): 315-320.
- Novikova, N.S., Kazakova, T.B.,Rogers, V.,Korneva, A. (2008). Expression of c-Fos Gene in the rat Hypothalamus in electrical pain stimulation and UHF stimulation of the ski. Neuroscience and Behavioral Physiology, 38:415-420.
- Ogura, Y. Naito, H., Tsurukawa, T., Ichinoseki-Sekine, N., Saga, N., Sugiura, T., Katamoto, S. (2007). Microwave hyperthermia treatment increases heat shock proteins in human musculoskeletal muscle. Br J Sports Med ;41(7):453-5.
- Ohtsuka, K., Suzuki, T. (2000). Roles of molecular chaperones in the nervous system. Brain Research Bulletin, 53(2)141-146.
- Olivier, B., Zethof, T., Pattij, T., Van Boogaert, M., van Oorschot, R., Leahy, C., Oosting, R., Bouwknecht, A., Veening, J., van der Gugten, J., Groenink, L. (2003). Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. Eur J Pharmacol., 463(1-3):117-32.
- Oskar, K.J., Hawkins, T.D. (1977). Microwave alteration of the blood-brain barrier system of rats. Brain Research ,126: 281-293,.
- Otto, M., von Mühlendahl, K.E. (2007) . Electromagnetic fields (EMF): do they play a role in children's environmental health (CEH)? International Journal of Hygiene and Environmental Health 210(5):635-644.
- Pacák, K., Armando, I., Fukuhara, K., Kvetnansky, R., Palkovits. (1992). Noradrenergic activation in the paraventricular nucleus during acute and chronic immobilization stress in rats: an in vivo microdialysis study. Brain Research.589,91-96.
- Pacák, K., Palkovits, M. (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. Endocrine Reviews 22(4); 502-548.
- Palkovits, M.(2000). Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. European Journal of Pharmacology,405: 161-166.
- Papadopoulos, G.C. (1993). Differential activation of the cortical visual areas in visually deprived rats. J Hirnforsch; 34(4):539-44.

- Patchev, V.K., Brady, L.S., Karl M., Chrousos, G.P. (1994) Regulation of HSP-90 and corticosteroid receptor mRNA by corticosterone levels in vivo. Molecular and Cellular Endocrinology.103:57-64.
- Patchev, V.K., Brady, L.S., Karl, M., Chrousos, G.P.(1994). Regulation of HSP90 and corticosteroid receptor mRNA by corticosterone levels in vivo.Mol Cell Endocrinol. Jul; 103(1-2):57-64.
- Patronas, P., Horowitz, M., Simon, E., Gerstberger, R., (1998). Differential stimulation of c-fos expression in hypothalamic nuclei of the rat brain during short-term heat acclimation and mild dehydration. Brain Res., 798: 127-139.
- Paulraj, R., Behari, J. (2006).Protein kinase C activity in developing rat brain cells exposed to 2.45 GHz radiation. Electromagnetic Biology Medicine. 25(1):61-70.
- Paxinos and Watson, (1998) G. Paxinos and C. Watson, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates .4th Edition ed, Academic Press, London
- Pearl, L.H., Prodromou, C., Workman, P. (2008)The Hsp-90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. Biochem J, 410: 439-453.
- Peinnequin, A., Piriou, A., Mathieu, J., Dabouis, V., Sebbah, C., Malabiau, R., Debouzy, J.C. (2000). Non-thermal effects of continuous 2.45 GHz microwaves on Fas-induced apoptosis in human Jurkat T-cell line. Bioelectrochemistry. 51(2):157-61.
- Penny, M.L., Stacy, B.B., Cornelius, J., Higgs, A.N.K., Cunningham, T. (2005). The effects of osmotic stimulation and water availability on c-Fos and FosB staining in the suprapotic and paraventricular nuclei of hypothalamus.Exp. Neurol., 194(1): 191-202.
- Perez, F.P., Zhou, X., Morisaki, J., Jurivich, D.(2008). Electromagnetic field therapy delays cellular senescence and death by enhancement of the heat shock response. Exp Gerontol.43(4):307-16.
- Phelan,A.M.; Neubauer,C.F.; Timm,R.; Neirenbeg,J.; Lange,D.G. (1994). Athermal alterations in the structure of the canalicular membrane and ATPase activity induced by thermal levels of microwave radiation. Radiation Research. 137(1): 52-58.
- Pignataro, L., Miller, A.N., Ma, L., Midha, S., Protiva, P., Herrera, D.G., Harrison, N.L. (2007) Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1. J Neurosci. 221;27(47):12957-66.
- Powers, M.V., Workman, P. (2007). Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. FEBS Letter, 581, pp. 3758-3769.
- Pratt, W.B. (1997) The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 37:297-326.
- Premkumar ,D.R., Arnold, B., Pollack, I.F.. (2006). Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with 17-AAG on glioma cell growth. Molecular carcinogenesis 45:288-301.

- Puelles López, L. ; Martínez Pérez, S. ; Martínez de la Torre, M. (2008). Capítulo 28. Corteza cerebral : isocortex y allocórtex. Tipos y áreas isocorticales. Pp : 202-210. Neuroanatomía. Editorial Médica panamericana. ISBN : 978-84-7903-453-5.
- Purves, W.K. (2004). The Science of Biology. Editorial W.H. Freeman y Co. LTD. ISBN: 978-0-7167-8851-5.
- Quraishi, H., Brown, I.R. (1995). Expression of heat shock protein 90(HSP90) in neural and nonneural tissues of control and hyperthermic rabbit. Experimental. Cell. Research., 219:358-363.
- Radzievsky, A.A., Gordiienko, O.V., Alekseev, S., Szabo, I., Cowan, A., Ziskin, M.C. (2008). Electromagnetic millimeter wave induced hypoalgesia: frequency dependence and involvement of endogenous opioids. Bioelectromagnetics., 29(4):284-95
- Rajapandi, T., Greene, L.E., Eisenberg, E. (2000). The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. J Biol Chem., 275(29):22597-60.
- Ramaglia, V, Buck, L.T. (2004). Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of anoxic western painted turtle. The Journal of Experimental Biology., 207:3775-3784.
- Ramaglia, V., Harapa, G. M., White, N., Buck, L.T. (2004). Bacterial infection and tissue-specific Hsp72-73 and-90 expression in western painted turtles. Comparative Biochemistry and Physiology, 138: 139-148.
- Rao, S., Henderson, A.S. (1996). Regulation of c-fos is affected by electromagnetic fields. Journal of Cellular Biochemistry, 63:358-365
- Refinetti, R. (2003) Metabolic heat production, heat loss and the circadian rhythm of body temperature in the rat. Exp. Phys., 88 (3), 423-429.
- Regel, S.J., Tinquely, G., Schuderer, J., Adam, M., Kuster, N., Landolt, H.P., Achermann, P. (2007). Pulsed-radiofrequency electromagnetic fields: dose-dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive performance. Journal of Sleep Research., 16(3):253-258.
- Rioja Toro J. (1996). Electroterapia y Electrodiagnóstico. Universidad de Valladolid. Sanofi-Winthrop. 2ª Edición. Portugal. ISBN: 84-7762-347-3.
- Robertson, V.J., Ward, A., Low, J., Reed, A. (2006) Electrotherapy Explained. Principles and Practice. Elsevier. ISBN: 978-0-7506-8843-7.
- Robertson, V.J., Ward, A.R., Jung, P., (2005). The effect of heat on tissue extensibility: a comparison of deep and superficial heating. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 86: 819-825.
- Robinson, D.A., Wei, F., Wang, G.D., Li, P., Kim, S.J., Vogt, S.K., Muglia, L.J., Zhuo, M. (2002). Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. J Physiology, 540(Pt 2): 593-606.

- Rodina, A., Vilenchik, M., Moulik, K., Aguirre, J., Jim, J. y cols. (2007). Selective compounds define Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. Nature Chemical Biology, 3(8): 498-507.
- Rose, M. (1926) .Der allocortex bei tier und mesung. J. Psychol. Neurol. (Leipzig), 34, 1 -111,
- Saldford, L.G., Brun, A.E., Eberhardt, J.L, Malmgren L., Persson, B.R.R. (2003). Nerve Cell Damage in Mammalian Brain after Exposure to Microwaves from GSM Mobile Phones. Environmental Health Perspectives., 11(7): 881-883.
- Samarketu, S.P.; Singh, S.P. (1996).Effect of direct modulated microwave modulation frequencies exposure on physiology of cyanobacterium *Anabea dolilum*. Asia Pacific Microwave Conference, Vol. B.2.1. 155-158.
- Sánchez, S., Masuda, H., Ruffié, G., De Gannes, F.P., Billaudel, B., Haro, E., Lévêque, P., Lagroye, I., Veyret, B. (2008). Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. III: Expression of heat shock proteins. Int J Radiat Biol. 84(1):61-8.
- Sangster, T.A., Salathia, N., Undurraga, S., Milo, R., Schellenberg, K., Lindquist, S., Queiysch, C. (2008). HSP90 affects the expression of genetic variation and developmental stability in quantitative traits. Proceedings of the national Academic of Sciences, 105(8):2963-2968.
- Santoro, M.G. (2000). Heat shock factors and the control of the stress response. Biochemical Pharmacology, 59: 55-63.
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W. (1981) Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic response. Science, 214 (4521), 685-7.
- Scheibel, T., Buchner, J. (1998) The Hsp90 complex-a super-chaperone machine as a novel drug target. Biochem Pharmacol. 56(6):675-82.
- Scheibel, T., Siegmud, H.I., Jaenicke, R., Ganz, P, Lilie, H., Buehner, J. (1999).The charged region of hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 1297-1302.
- Schimid, G., Neubauer, G., Mazal, P.R. (2003). Dielectric properties of human brain tissue measured less than 10h postmortem at frequencies from 800 to 2450 MHz. Bioelectromagnetics, 24: 423-430.
- Schmid and Partner Engineering, A.G. (2005). Reference manual for the SEMCAD. Simulation platform for electromagnetic compatibility, antenna design and dosimetry. Available from <http://www.semcad.com>.
- Schönborn, F., Pokovic, K., Kuster, N. (2004). Dosimetric analysis of the carousel setup for the exposure of rats at 1.62 GHz. Bioelectromagnetics, 25: 16-26.
- Schroeder, M.J., Sadasiva, A., Nelson, R.M. (2008). An analysis on the role of wáter content and state on effective permittivity using mising formulas. Biomechanics, Biomedical and Biophysical Engineering, 2(1): 1-10.

- Sebastián-Franco, J.L.; Muñoz-San Martín, S.; Sancho-Ruíz, M.; Miranda-Pantoja, J.M. Medición de radiaciones en seres vivos. Investigación y Ciencia, febrero 2006, p: 46-55.
- Senba, E., Matsunaga, K., Tohyama, M., Noguchi, K. (1993). Stress induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway. Brain Research Bulletin, 31:329-341.
- Shanin, S.N., Rybakina, E.G., Novikova, N.N., Kozinets, I.A., Rogers, V.J., Korneva, E.A. (2005). Natural killer cell cytotoxic activity and c-Fos protein synthesis in rat hypothalamic cells after painful electric stimulation of the hind limbs and EHF irradiation of the skin. Med. Sci. Monit. 11(9): 309-315.
- Sharp, F.R., Sagar, S.M., Hicks, K., Lowenstein, D., Hisanaga, K. (1991). C-Fos mRNA, Fos and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress, J. Neurosci., 11(8): 2321-2331.
- Shibasaki, T., Tsumori, C., Hotta, M., Imaki, T., Yamada, K., Demura, H. (1995). The response pattern of noradrenaline release to repeated stress in the hypothalamic paraventricular nucleus differs according to form of stress rats. Brain Research, 670: 169-172.
- Shintani, S., Zhang, T., Aslam, A., Sebastian, K., Yoshimura, T., Hamakawa, H. (2006). P53-dependent radiosensitizing effects of HSP90 inhibitor 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin on human oral squamous cell carcinoma cell lines. International Journal of Oncology, 28: 1111-1117.
- Sidera, K., Samiotaki, M., Yfanti, E., Panayotou, G., Patsavoudi, E. (2004). Involvement of cell surface HSP90 in cell migration reveals a novel role in the developing nervous system. The Journal of Biological Chemistry, 279 (44), 379-388.
- Sidorenko AV, Tasaryuk VV. (2002). The effects of electromagnetic radiation in the millimeter range on the brain bioelectrical activity, Radiatsionnaya Biologiya; 42(5): 546-550.
- Sidorov, V.D., Pershin, S.B., Bobkova, A.S., Galenchik, A.I. (1991). The immunomodulating effect of microwaves and of an ultrahigh-frequency electrical field in patients with systemic lupus erythematosus : Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. (4):36-40.
- Siegel, R., Chowder, I., Conforti, N., Feldman, S.(1980) Corticotrophin and corticosterone secretory patterns following acute neurogenic stress, in intact and in variously hypothalamic deafferented male rats. Brain Res. 28; 188(2):399-410.
- Silverman, C. (1973). Nervous and behavioral effects of microwave radiation in humans. American Journal of Epidemiology, 97 (4): 219-224.
- Sinha, R.K., Aggarwal, Y., Upadhyay, P.K., Dwivedi, A., Keshri, A.K., Das, B.N. (2008). Neural network-based evaluation of chronic non-thermal effects of modulated 2450 MHz microwave radiation on electroencephalogram. Annals of Biomedical Engineering, 36(5): 839-851
- Someren, J.S., Faber, L.E., Klein, J.D., Tumlin, J.A. (1999) .Heat shock proteins 70 and 90 increase calcineurin activity in vitro through calmodulin-dependent and independent mechanisms. Biochem Biophys Res Commun., 260(3):619-25.

- Spitznagel, H., Baulmann, J., Blume, A., Unger, T., Culman, J. (2001). C-FOS expression in the rat brain in response to substance P and neurokinin B. Brain Res. Oct 19;916(1-2):11-21.
- Sreedhae, A.S., Nardai, G., Csermeley, P. (2004). Enhancement of complement induced cell lysis: a novel mechanism for the anticancer effects of HSP-90 inhibitors. Immunology Letters, 92: 157-161.
- Sreedhar, A.S., Kalmár, E., Csermely, P., Shen, Y. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. FEBS Letters, 562: 11-15.
- Srivastava P. K (2008) .Función biológica de las chaperonas. Investigación y Ciencia.28-33.
- Stagg, R.B., Hawel, L.H , Pastorian, K., Cain, C., Adey, W.R., Byus, C.V. (2001) Effect of immobilization and concurrent exposure to a pulse-modulated microwave field on core body temperature, plasma ACTH and corticosteroid, and brain ornithine decarboxylase, Fos and Jun mRNA. Radiat Res. 155(4):584-92.
- Stamp J.A.and Herbert J. (1999). Multiple immediate-early gene expression during physiological and endocrine adaptation to repeated stress. Neuroscience. 94 (4) 1313-1322.
- Sun, W.L., Zhou, L., Hazim, R., Quinones-Jenab, V., Jenab, S. (2008). Effects of dopamine and NMDA receptors on cocaine-induced Fos expression in the striatum of Fischer rats. Brain Res.,1243:1-9.
- Swicord, M., Morrissey, J., Zakharia, D., Ballen, M., Balzano, Q. (1999). Dosimetry in mice exposed to 1.6 GHz microwaves in a carousel irradiator. Bioelectromagnetics 20: 42-47
- Szakács, R., Facekas, I., Mihály, A., Krisztin-Péva, B., Juhász, A., Janka, Z. (2008).Single-dose and chronic corticosterone treatment alters c-Fos or FosB immunoreactivity in the rat cerebral cortex. Acta Histochemica, Dec 18.
- Takata, K., Kitamura, Y., Kawasaki, T., Taniguchi, T., Shimohama, S. (2003). Heat shock protein-90-induced microglial clearance of exogenous amyloid- β_{1-42} in rat hippocampus in vivo. Neuroscience Letters 344:87-90.
- Taylor, D.M., Tradewell, M.L., Minotti, S., Durham, H.D. (2007). Characterizing the role of Hsp90 in production of heat shock proteins in motor neurons reveals a suppressive effect of wild-type Hsf1. Cell Stress & Chaperones, , 12(2): 151-162.
- Testylier, G., Tonduli, L., Malablau, R., Debouzy, J.C.(2002). Effects of exposure to low level radiofrequency fields on acetylcholine release in hippocampus of freely moving rats. Bioelectromagnetics. 23(4):249-255.
- Thorlin, T., Rouquette, J.M., Hamnerius, Y., Hansson, E., Persson, M., Björklund U., Rosengren, L., Rönnbäck, L., Persson, M. (2006). Exposure of cultured astroglial and microglial brain cells to 900 MHz microwave radiation. Radiation Research, 166: 409-421.

- Tian F, Nakahara T, Wake K, Taki M, Miyakoshi. (2002). Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields induces hsp70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not at 5 W/kg but not at 5W/kg in human glioma MO54 cells. International Journal of Radiation Biology 78(5): 433-440.
- Tissiéres, A.; Mitchell, H.K.; Tracy, U.M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J.Mol. Biol., 84, 389-398.
- Tsurita, G., Nagawa, H., Ueno, S., Watanabe, S., Taki, M. (2000). Biological and Morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field. Bioelectromagnetics, 21:364-371.
- Tynell, M., Barbe, M.F., Brown, I.R. (1993). Stress (heat shock) protein in accumulation in the central nervous system. Advances in Neurology, 59, 293-303.
- Uryu, K., Richter-Landsberg, C., Welch, W., Sun, E., Goldbaum, O., Norris, E.H., Pham, C.T., Yazawa, I., Hilburger, K., Micsenyi, M., Giasson, B.I., Bonini, N.M., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2006) Convergence of heat shock protein 90 with ubiquitin in filamentous alpha-synuclein inclusions of alpha-synucleinopathies Am J Pathol. 168(3):947-6.
- Vamvakopoulos, N.O. (1993). Tissue-specific expression of heat shock proteins 70 and 90: potential implication for differential sensitivity of tissues to glucocorticoids. Mol Cell Endocrinol. 98(1):49-54
- Van Bergen en Henegouwen, P.M., Berbers, G., Linnemans, W.A., Van Wijk. (1987). Subcellular localization of the 84,000 dalton heat-shock protein in mouse neuroblastoma cells: evidence for a cytoplasmatic and nuclear localization. Eur J Cell Biol. 43(3): 469-478.
- Vendrell, M., Curran, T., Morgan, J.I. (1998). A gene expression approach to mapping the functional maturation of the hippocampus. Brain Research. Molecular Brain research. 63(1): 25-34.
- Viau, V., Sawchenko, P.E. (2002). Hypophysiotropic neurons of paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs repeated restraint stress. J. Comp. Neurol., 445,293-307.
- Vorobyov, V., Pesic', V., Janac', B., Prolic', Z. (2004). Repeated exposure to low-level extremely low frequency-modulated microwaves affects baseline and scopolamine-modified electroencephalograms in freely moving rats.International Journal of Radiation Research, 80(9): 691-8.
- Vrang, N., Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., Larsen, L.K., Kristensen, P. (2003) Hypothalamic cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) is regulated by glucocorticoids. Brain Res. 7; 965(1-2):45-50.
- Wadekar, S.A., Li, D., Periyasamy, S., Sánchez, E.R. (2001). Inhibition of heat shock transcription factor by GR. Mol Endocrinol. 15(8):1396-410.
- Walsh, D., Li, Z., Wu, Y., Nagata, K. (1997). Heat shock and the role of the HSPs during neural plate induction in early mammalian CNS and brain development. Cell and Molecular Life Sciences, 53: 198-211.

- Walters, T.J., Ryan, K.L., Tehrany, M.L., Jones, M.B., Paulus, L.A., Mason, P.A. (1998). Hsp70 expression in the CNS in response to exercise and heat stress in rats. Journal of Applied Physiology, 84(4): 1269-1277.
- Wang,S.M., Khandkar, J., Kaul, K., Winchester, D., Morimoto, R.. (1999). A method for the quantitative analysis of human heat shock gene expression using a multiplex RT-PCR assay. Cell stress chaperones .4, 77-82.
- Wang; J., Koyama, S., Komatsubar, Y., Suzuki, Y., Taki, M., Miyakoshi, J. (2006). Effects of a 2450 MHz High-Frequency electromagnetic field with a wide range of SARs on the induction of heat-shock proteins in A172 cells. Bioelectromagnetics, 27: 479-486.
- Ward, T.R. Svensgaard, D.J., Spiegel, R.J., Puckett, E.T., Long, M.D., Kinn, J.B. (1986). Brain temperatura measurements in rats: a comparison of microwave and ambient temperature exposures. Bioelectromagnetics, 7:243-258
- Waza, M., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Tanaka, F., Doyu, M., Sobue, G. (2006). Modulation of Hsp90 function in neurodegenerative disorders: a molecular-targeted therapy against disease-causing protein. J Mol Med., 84: 635-646.
- Wegener, N., Koch, M. (2008). Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. Brain Res., Dec 3.
- Whitehead TD, Brownstein BH, Parry JJ, Thompson D, Cha BA, Moros EG, Rogers BE, Roti Roti JL. (2005). Expression of proto-oncogene Fos after exposure to radiofrequency radiation relevant to wireless communications. Radiat. Res., 64 (4 pt 1): 420-30.
- Whitesell, L., Sutphin, P.D., Pulcini, E.J., Martínez, J.D., Cook, P.H. (1998). The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. Molecular and Cellular Biology, (3), 1517-1524.
- Williams, P.L., WarniK, R. (1985). Anatomía de Gray. Vol. 2. Editorial Harcourt España.
- Williams, W.M.; Lu, S.T.; Del Cerro, M.; Michaelson, S.M. (1984). Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood-brain barrier to hydrophilic molecules. D. Brain temperature and blood-brain barrier permeability to hydrophilic tracers. Brain Research, 319(2): 191-212.
- Wundergem, J., Havema, J., Rusman, V, Sminia, P., Van Dijk, J.D. (1988). Effects of local hyperthermia on the motor function of the rat sciatic nerve. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med., 53(3), 429-438.
- Wong, M.L., Weiss, S.R., Gold, P.W., Doi, S.Q., Banerjee, S., Licinio, J., Lad, R., Post, R.M., Smith, M.A. (1992). Induction of constitutive heat shock protein 73 mRNA in the dentate gyrus by seizures. Brain Res Mol Brain Res., 13(1-2):19-25.
- Wotjak, C.T., Naruo, T., Muraoka, S., Simchen, R., Landgraf, R., Engelmann, M. (2001) Forced swimming stimulates the expression of vasopressin and oxytocin in magnocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. Eur J Neurosci, 13(12):2273-81.

- Wright, W., Sluka, K. (2001). Nonpharmacological treatments for musculoskeletal pain. Clinical Journal of Pain, 17, 33-46.
- Wyper, D.J., McNiven, D.R. (1976). The effect of microwave therapy upon muscle blood flow in man. Br. J. Sports Medicine, 10:19-21.
- Xiao, J., Li, S., Wang, W., Li, Y., Zhao, W. (2007). Protective effects of overexpression TCR V β 5.2-HSP70 and TCRV β 8.2-HSP70 against collagen-induced arthritis in rats. Cellular & Molecular Immunology, 4(6): 439-445.
- Xu, S., Ning, W., Xu, Z., Zhou, S., Chiang, H., Luo, J. (2006). Chronic exposure to GSM 1800 MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons. Neuroscience Letters, 398: 253-257.
- Yang, J., Chen, J.M., Song, C.Y., Liu, W.Y., Wang, G., Wang, C.H., Lin, B.C. (2006). Through the central V2, not V1 receptors influencing the endogenous opiate peptide system, arginine vasopressin, not oxytocin in the hypothalamic paraventricular nucleus involves in the antinociception in the rat. Brain Res., 1069(1):127-38.
- Yang, J., Chen, J.M., Yang, Y., Liu, W.Y., Song, C.Y., Lin, B.C. (2008). Investigating the role of hypothalamic paraventricular nucleus in nociception of the rat. Int J Neurosci., 118 (4):473-85.
- Yang, J., Yang, Y., Wang, C.H., Wang, G., Xu, H., Liu, W.Y., Lin, B.C. (2009). Effect of arginine vasopressin on acupuncture analgesia in the rat. Peptides, 30(2):241-7.
- Yoshida, K., Saper, K., Kanosue, C.B., Konishi, K., Nagashima, M. (2005). Fos activation in hypothalamic neurons during cold or warm exposure: projections to periaqueductal gray matter. Neuroscience, 133(4): 1039-1046.
- Young, P.A. (2000). Neuroanatomía Clínica Funcional. Ed. Masson. Williams & Wilkins España, S.A.
- Yun, S.J., Hahm, D.H., Lee, E.H. (2002). Immobilization stress induces the expression of $\alpha\beta$ -crystallin in rat hippocampus: implications of glial activation in stress-mediated hippocampal degeneration. Neuroscience Letters, 324:45-48.
- Zaragoza, J.R. (1992). Física e instrumentación médicas. 2ª edición. Editorial Masson-Salvat Medicina. ISBN: 84-458-0017-5.
- Zhao, C., Hashiguchi, A., Kondoh, K., Du, W., Hata, J., Yamada, T. (2002). Exogenous expression of heat shock protein 90kDa retards the cell cycle and impairs the heat shock response. Exp Cell Res., 275(2):200-14.
- Zhao, Y.L., Peng, X.D., Yang, Y.H., Ma, H.B. Song, J.P., Pu, J.S. (2004). Effects of 2450 MHz microwave on long-term potentiation of hippocampus and lipofuscin contents in rats brain. Space Med. Med. Eng., 17: 111-113.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. Cell, 94(4):471-80.

VIII. APÉNDICE

LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS HAN SIDO PUBLICADOS EN LOS SIGUIENTES ARTÍCULOS:

A) PUBLICACIONES EN CONFERENCIAS INTERNACIONALES:

- 1) Jorge-Mora, M.T., Misa-Agustiño, M.J., Bregains, J.C., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (2006). Microwave exposure of rats to thermal and non-thermal 2.450 MHz radiation produces changes in neuronal expression of heat shock protein (HSP-90). *Proceedings of Biological Effects of Electromagnetic Fields, EMF. (2)* 1030-1034. ISBN: 960-233-173-9008.
- 2) Jorge-Mora, M.T., Misa-Agustiño, M.J., Villamayor-Blanco, B., Miguez-López, A., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (2006). Expression of heat shock protein 90 (HSP-90) on central nervous system (CNS) of control thermoregulation after microwave exposure of rats. XVth European Congress of Physical and Rehabilitation Medicine.
- 3) Jorge-Mora, M.T., Bregains, J.C., Misa-Agustiño, M.J., Ares-pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (2008). C-Fos expression induced by microwave-frequency electromagnetic GTEM radiation at 2450 MHz on anterior hypothalamus of rats.

B) PUBLICACIONES EN REVISTAS:

- 1) Jorge-Mora, M. T., Bregains, J.C., Leiro J., Jorge-Barreiro, F.J., Ares-Pena, F.J., López-Martín, E. (2009). Exposure to 2.45 GHz microwave radiation provokes cerebral changes in induction of hsp90 α/β heat shock protein in rat. Journal of Neuroscience Research (aceptada).
- 2) Jorge-Mora, M.T., Misa-Agustiño, M.J., Bregains, J.C., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (2009). The effects of radiofrequency fields at 2.45 GHz on c-Fos protein expression in paraventricular nucleio f the hypothalamus in rat (en revisión).

C) PARTICIPACIÓN EN PUBLICACIONES INTERNACIONALES EN RELACION AL TEMA DE ESTA TESIS:

- 1) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora, C., Brégains, F. J., Ares-Pena, F. J., Jorge-Barreiro, E. López-Martín. (2006). Exposure of rat thyroid gland to 2450 MHz microwave induces changes in expression of HSP-90. Proceedings of Biological Effects of Electromagnetic Fields, EMF.(2) 1030-1034 ISBN: 960-233-173-9008.
- 2) Misa-Agustiño, M.J.; Lage-García, S., Jorge-Mora, M.T., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (2006). Morphologic study of HSP90 expression on thyroid gland of rat in a diathermia experimental model. XVth European Congress of Physical and Rehabilitation Medicine. Madrid.
- 3) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora, M.T., Bregains, J., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Exposure of rat thyroid to 2450 MHz microwaves induce changes on stress protein expression HSP-90. En elaboración.
- 4) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora, M.T., Bregains, J., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Heat shock stress stimulation of rat thymus by local application of radiofrequency fields at 2.45 GHz. En elaboración.

