

ANÁLISIS COMPARATIVO DE SAR Y ESTRÉS EN ANIMALES PEQUEÑOS EN DOS SISTEMAS DE RADIACIÓN DE ONDA VIAJERA Y DE ONDA ESTACIONARIA A 900 MHz

L. López Vila^(1,2), A. Salas Sánchez⁽¹⁾, E. Moreno Piquero⁽¹⁾, J. A. Rodríguez González⁽¹⁾, F. J. Ares Pena⁽¹⁾ E. López Martín⁽²⁾

lucia.lopez15@rai.usc.es, aaronangel.salas@gmail.com, eduardo.moreno@usc.es, ja.rodriguez@usc.es, francisco.ares@usc.es, melena.lopez.martin@usc.es

⁽¹⁾ Dpto. de Física Aplicada. Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela.

⁽²⁾ Dpto. de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela.

Abstract- Exposure to non-ionizing electromagnetic radiation is increasing every day through mobile phones. In this experiment we try to find the influence of this exposure in twenty-four Sprague-Dawley rats brain when radiation is caused by a GTEM chamber (travelling wave chamber) and by a stationary wave chamber. Both chambers are irradiating at frequency of 900 MHz. The experimental system consisted of a vector signal generator, a directional coupler, a power meter and the two enclosures (working separately) where the animal was immobilized by a methacrylate holder. In order to determine the radiation effects, rectal thermal measures are performed to calculate the SAR (*Specific Absorption Ratio*) values in the brain. We performed a comparison between the radiation dosimetry, compared the stress levels of the animals and finally we studied the neuronal activation with immunohistochemistry test c-fos in the brain of animals exposed to radiation in both chambers. We found that a GTEM chamber gives lower values for the average SAR than a stationary wave chamber. Stress levels in animals are higher in the cavity standing wave than in the GTEM. Postmortem neuronal activation in the brain appears with a different pattern: unilateral in traveling wave and bilateral in standing-wave.

I. INTRODUCCIÓN

Los estudios experimentales llevados a cabo en sistemas de radiación con animales pequeños, permiten un control de los parámetros electromagnéticos y un análisis posterior de la dosimetría [1] de exposición a frecuencias, que se utilizan habitualmente con los teléfonos inalámbricos.

La metodología experimental utilizada para el cálculo del SAR es variable, desde la medición directa del campo eléctrico [2], mediante sondas termométricas, [3] o un método combinado donde se aplican los valores experimentales y el sistema computacional FDTD [4]. La determinación de los niveles de estrés que se inducen a los animales durante la exposición es un índice biológico que necesitamos conocer para realizar una valoración final de los efectos después de la radiación. La medida de la temperatura corporal en los animales durante la radiación puede constituir un marcador de estrés [3, 5] que nos permitirá al mismo tiempo el cálculo de

la tasa de absorción específica (SAR) utilizando los valores térmicos corporales [6].

La detección de la proteína c-Fos en las áreas más importantes del cerebro mediante un test de inmunohistoquímica postmortem constituye un marcador sensitivo de activación neuronal [7] y nos informa de la respuesta del sistema nervioso ante estímulos externos. Estudios que realizamos previamente en una cavidad de onda estacionaria simulando la señal GSM de los móviles a 900 MHz, [8] permitieron detectar cambios importantes en la actividad cerebral (clínicos, electroencefalográficos -EEG- y morfológicos) en un modelo subconvulsivo en ratas con picrotoxina. Otros estudios, en una cámara de onda viajera (GTEM) [9] a frecuencias de 900 y 1800 MHz determinaron que un modelo subconvulsivo en ratas hembra Sprague-Dawley presentaba un descenso en la activación neuronal (c-fos positivo) al someter a los animales a la acción simultánea de la picrotoxina y la radiación.

En este trabajo utilizaremos una señal monocromática de RF de 900 MHz que simula la RF de los teléfonos móviles, para irradiar en el cerebro de ratas hembra Sprague-Dawley situadas en las cavidades (una de onda viajera, GTEM y otra de onda estacionaria). La medición de la temperatura rectal antes y después de la radiación de los animales ha sido la herramienta para determinar los niveles de estrés y del cálculo del SAR comparando finalmente los resultados obtenidos en una y otra cavidad. Los valores de SAR obtenidos en ambas cavidades de radiación, nos permitirán realizar un análisis del grado de interacción de la radiación no ionizante absorbida por los tejidos de los animales en ambas cavidades. Finalmente se harán estudios comparativos post-mortem en los cerebros de los animales de detección de la proteína c-Fos para determinar el grado de activación neuronal que se produce en los animales expuestos a la radiación en cada una de las cavidades.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se muestran los dos sistemas experimentales empleados para la realización del experimento, así como el método seguido y la forma de cálculo de los valores del SAR:

A. Descripción del sistema experimental de radiación.

Como indicamos anteriormente hemos usado 2 cavidades: la primera (que llamaremos cavidad de onda estacionaria) fue diseñada con el fin de exponer a pequeños animales a ondas estacionarias de radiofrecuencia y poder así medir la potencia absorbida por el animal (Fig. 1). Se trata de una caja metálica de 150 cm de largo, 70 cm de alto y 46 cm de ancho (medidas interiores) con una antena de transmisión. La segunda cavidad (de onda viajera) es una cámara de radiación comercial GTEM 250 (Fig. 2).

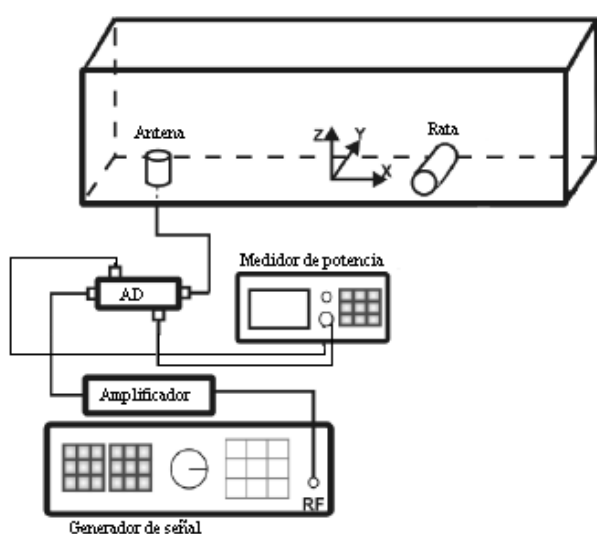


Fig. 1. Esquema del sistema experimental de la cavidad de onda estacionaria (no a escala).

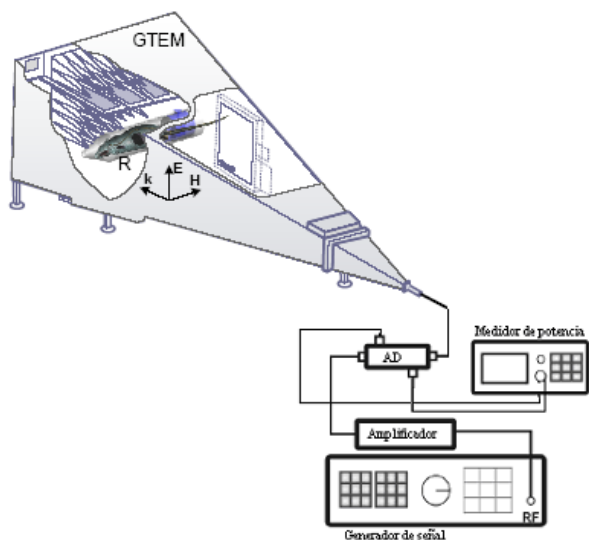


Fig. 2. Esquema del sistema experimental utilizado de la GTEM SCHAFFNER 250 (no a escala).

El montaje experimental para ambas cámaras es el siguiente: el generador de señales vectorial (GSV) (AGILENT E4438C (250KHz-4GHz), alimenta al amplificador (AMP) (AMPLIFIER RESEARCH 15S1G3 (15 Watts 0,8-3,0 GHz) con una señal sinusoidal pura de 900 MHz, la salida procedente del amplificador se conecta al acoplador direccional (AD) (NARDA 3282B-30, (800-4000 MHz)) y de ahí directamente a la cámara de radiación (GTEM o cavidad de onda estacionaria). Las potencias incidente y reflejada son controladas durante todo el experimento con un medidor de potencia (MP) (AGILENT E4418B (9,0 KHz-26,5 GHz)).

B. Descripción del tratamiento de los animales

Se introducen 27 ratas Sprague-Dawley con pesos comprendidos entre 192.6 a 287.4 g en cepos de metacrilato para impedir su movilidad y posteriormente se sitúan en unos soportes dentro de las cavidades durante 1 hora.

Hemos considerado 4 grupos (6-8 ratas en cada grupo):

Grupo 1: radiación en GTEM a 900 MHz.

Grupo 2: sin radiación en GTEM.

Grupo 3: radiación en cavidad de onda estacionaria a 900 MHz.

Grupo 4: sin radiación en cavidad de onda estacionaria.

C. Determinación del SAR:

Los valores de SAR han sido calculados mediante medidas de temperatura rectal, antes y después de radiar (con un termómetro digital (TESTO AG 950 (-200°C, 600°C)) de dos decimales de precisión) puesto que puede establecerse una relación 1:1 entre la temperatura del recto y la del cerebro [6].

También se realizaron medidas de la temperatura ambiente, no obstante al encontrarse poca variación en ellas se consideró que no influían en la temperatura de los animales.

Se calcula por tanto el SAR en el cerebro tal como se indica en la siguiente fórmula:

$$SAR_{AT} = C_c \Delta T / \Delta t \quad (1)$$

siendo:

- $C_c = 3700$ [J/Kg°C] el calor específico del cerebro.
- ΔT el incremento de temperatura producido durante la radiación.
- Δt el intervalo de tiempo de exposición (1 hora).

D. Procesamiento del tejido, tinciones y estudios de Inmunohistoquímica.

Después de exponer a los animales en la cámara los 60 minutos de radiación y de esperar para su sacrificio 90 minutos, se anestesiaron a los animales profundamente con pentotal y se perfundieron transcárdialmente vía aorta ascendente, primero con salino al 0,9% y paraformaldehído al 4% en tampónfosfato 0,1M de pH 7,4. Se extrajeron los cerebros, se crioprotegieron y finalmente se cortaron en secciones seriadas a 40 micras en un micrótopo de congelación.

1) Técnicas de tinción: Se llevaron a cabo dos técnicas de tinción del tejido del sistema nervioso para la observación del estado del tejido. Con el tejido previamente hidratado pasando previamente por alcohol de 100° (5 min) 2 veces,

alcohol de 96° dos veces, alcohol de 70° (5 min) una vez, agua destilada (10 min). Posteriormente se procede a la tinción del tejido azul de toluidina o violeta de cresilo ambos colorante al 1% durante 20 minutos. Antes de montar las muestras hay que volver a secarlas, esto se hace con un paso rápido por alcoholes durante 1 minuto, 2 veces en el de 90° y 2 veces en el de 100°.

2) Técnica de Inmunohistoquímica Las secciones se sometieron 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 ó 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 90 minutos a temperatura ambiente con el consiguiente antisuero secundario biotilado a una concentración de 1:200. Las secciones marcadas con biotina se lavaron y se incubaron posteriormente otros 30 minutos 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).

E. Estudios estadísticos

Se llevó a cabo el análisis de las temperaturas rectales en los animales antes y después de la radiación y los valores de SAR en relación a los animales control para cada cavidad (animales que permanecen en la cavidad sin radiar). Los valores se expresaron como las medias individuales de cada animal o del experimento (\pm error estándar) por grupo. En este experimento las diferencias entre grupos (dos a dos) en relación al SAR o la temperatura se determinaron utilizando un ANOVA de una vía y test a posteriori de Holm-Sidak.

III. RESULTADOS

A. Estimaciones del SAR

Las ratas se radiaron durante 1 hora a una potencia de entrada de 2W y frecuencia de 900 MHz.

Los valores de SAR experimental se calcularon mediante la fórmula (1), obteniéndose para los animales control (que no se radiaron y permanecieron en el cepo) valores muy similares para ambas cavidades (ver Tabla 1). Esto indica una escasa influencia de factores relacionados con el estrés que podría sufrir el animal, tanto por el efecto de introducir la sonda a nivel rectal [10] como por la inmovilización [11] o por factores externos como la temperatura ambiente [12] (que en este experimento se ha mantenido en un valor medio de 26°C).

Los valores obtenidos para el promedio del SAR en el animal expuesto en la GTEM resultan inferiores que los obtenidos en el animal expuesto en la cavidad de onda estacionaria (ver Tabla 2). La interacción continua de la radiación no ionizante en la cabeza del animal determina un incremento mayor de temperatura y de tasa de energía absorbida por éste.

	Rata	Masa (g)	P _{absorbida}	ΔT (°C)	SAR (W/Kg)
GTEM	RG-1	192,6	0,013	0,07	0,072
	RG-2	218,3	0,017	0,08	0,082
	RG-3	233,3	0,324	1,35	1,388
	RG-4	287,4	0,336	1,14	1,172
	RG-5	190,2	0,231	1,26	1,215
	RG-6	200,5	0,122	0,63	0,607
	RG-7	197,3	0,038	0,2	0,193
	RG-8	196,3	0,129	0,68	0,655
Control GTEM	CG-1	201,6	0,033	0,16	0,164
	CG-2	205,2	0,076	0,36	0,370
	CG-3	216,9	0,234	1,05	1,079
	CG-4	214,8	0,139	0,67	0,646
	CG-5	197,5	0,063	0,33	0,318
	CG-6	181,8	0,028	0,16	0,154
Cavidad Onda estacionaria	R-1	214,1	0,160	0,73	0,750
	R-2	201	0,258	1,25	1,285
	R-3	220,3	0,151	0,67	0,688
	R-4	218,1	0,134	0,60	0,617
	R-5	222,3	0,159	0,74	0,713
	R-6	216,1	0,267	1,28	1,234
	R-7	194,3	0,069	0,37	0,357
Control Cavidad Onda estacionaria	C-1	210	0,218	1,01	1,038
	C-2	269,9	0,042	0,15	0,154
	C-3	230,7	0,092	0,39	0,401
	C-4	198,5	0,300	1,57	1,513
	C-5	197,6	0,082	0,43	0,414
	C-6	208,1	0,072	0,36	0,347

Tabla 1. Lista de valores del SAR estimados mediante medidas de la temperatura con sonda termométrica.

	MEDICIÓN DE TEMPERATURAS RECTALES	
	Antes de la radiación	Después de la radiación
Grupos experimentales		
Grupo 1	37,55 \pm 16.10 ⁻²	37,91 \pm 13.10 ⁻¹
Grupo 2	37,33 \pm 19.10 ⁻²	37,79 \pm 12.10 ⁻²
Grupo 3	37,21 \pm 17.10 ⁻²	37,9 \pm 15.10 ^{-1*}
Grupo 4	37,72 \pm 19.10 ⁻²	37,85 \pm 15.10 ⁻²

Tabla 2. Valores de temperaturas rectales medias \pm EEM antes y después de la radiación. * Indica diferencias después de la radiación respecto al grupo IV no radiado.

	SAR [W/Kg]
GTEM	0,369 \pm 2.10 ⁻¹
Control GTEM	0,438 \pm 1.10 ⁻¹
Onda Estacionaria	0,704 \pm 2.10 ^{-1*}
Control Onda Estacionaria	0,140 \pm 3.10 ⁻¹

Tabla 3. Valores de SAR medias \pm EEM en las dos cavidades de onda viajera y onda estacionaria. * Indica diferencias significativas en el SAR de cada cavidad respecto a los animales control.

1) Técnicas de tinción del tejido cerebral

La tinción mediante violeta de cresilo o azul de toluidina de las secciones seriadas de los cerebros de los animales estudiados (grupos 1-4) no indicaron en ningún caso datos de lesión o alteraciones en la morfología del tejido cerebral a la observación a microscopía óptica.

2) Activación neuronal mediante la técnica inmunohistoquímica de c-Fos.

- Grupo 1 y 2: En los animales expuestos en la GTEM (onda viajera) aparecen focos de activación de núcleos c-fos escasos en la corteza cerebral (frontal, parietal, piriforme) bilateralmente (en ambos hemisferios) en secciones rostrales. A medida que las secciones se hacen más caudales aparece un efecto de apantallamiento con activación unilateral en corteza frontal y alrededor de uno de uno de los ventrículos, y en el globo pálido del mismo lado sin ninguna activación en el lado contralateral. Tan solo aparece activación bilateral de los núcleos c-Fos a ambos lados del núcleo Paraventricular (NPV) del hipotálamo en los animales radiados en la GTEM. En los animales inmovilizados en el cepo pero no radiados (control) aparecen también focos de activación neuronal en la corteza cerebral (cingular, parietal, piriforme y entorrinal) de forma bilateral tanto en secciones rostrales como caudales. En los animales control no hay activación del núcleo Paraventricular.
- Grupos 3 y 4: En los animales expuestos a la radiación en la cavidad de onda estacionaria aparece una activación de c-Fos escasa y localizada bilateralmente a nivel de la corteza cingular y en la corteza parietal, también en áreas del Hipocampo como CA1 o CA3 en la región hipotálamica a ambos lados del tercer ventrículo y selectivamente aparece activación bilateral en el NPV (en Nas magnocelulares). En los animales inmovilizados y no radiados, en la cavidad de onda estacionaria aparece activación bilateral en la corteza del cíngulo, frontal, parietal, piriforme sin activación bilateral en el Núcleo paraventricular.

IV. CONCLUSIONES

Los resultados del estudio comparativo dosimétrico llevado a cabo en las dos cavidades de radiación (GTEM y onda estacionaria) con animales pequeños determinaron un incremento significativo de los niveles de estrés y SAR a la interacción continuada de las microondas a 900 MHz y 2 W de potencia mayor en el sistema de radiación de onda estacionaria. Esto nos hace pensar que la determinación de las temperaturas rectales de los animales y el posterior cálculo de la tasa de absorción específica a la radiación en ambos sistemas experimentales constituyen parámetros sensibles para la valoración de los posibles efectos de la interacción de los campos electromagnéticos en sistemas biológicos constituidos por mamíferos pequeños como los roedores. La determinación de la activación neuronal mediante la proteína c-Fos en el cerebro de los animales indicó un patrón diferente para ambas cavidades: un patrón de activación unilateral en los animales radiados en la GTEM y un patrón bilateral en los animales radiados en la cavidad de onda estacionaria.

Los autores agradecen a la Dirección General de Investigación y desarrollo de la Xunta de Galicia por su financiación a través del proyecto de investigación 09TIC006206PR, así como al Ministerio de Economía y Competitividad por su financiación a través del proyecto TEC-2011-24441. Los autores también agradecen la asistencia técnica de Rafael Fuentes, José Carlos Santos, Eva Domínguez y Eva García.

REFERENCIAS

- [1] E. Lopez Martín, J. L. Relova Quinteiro, J. Bregains, F. J. Ares Pena, "Acute exposure to a standing wave GSM-like mobile phone signal in rats treated with subconvulsive doses of picrotoxin: Effects on cerebral activity," *Mobile telephones Networks, Applications and Performance, cap 9*, Harper and R. V. Bures. (Eds), A.C Nova Science Publisher, New York. pp. 241-251, 2008.
- [2] J. L. Sebastián, S. Muñoz San Martín, M. Sancho, J. M. Miranda "Modelling the internal field distribution in human erythrocytes exposed to MW radiation," *Bioelectrochemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 39-45, 2004.
- [3] S. Ebert, S. J. Eom, J. Schuderer, U. Apostel, T. Tillmann, C. Dasenbrock, "Kuster Response, thermal regulatory threshold and thermal breakdown threshold of restrained RF-exposed mice at 905 MHz," *N. Phys Med Biol.*, vol. 50, no. 21, pp. 5203-5215, 2005.
- [4] E. Lopez Martín, J. C. Bregains, A. Trastoy Ríos, F. J. Jorge Barreiro, J. L. Sebastián Franco, E. Moreno Piquero, F. Ares Pena, "Cálculo del SAR en el Cerebro de Animales Pequeños expuestos a la Radiación de un Sistema Experimental GSM," *Efectos Biológicos*, URSI-2007.
- [5] R. Dallmann, S. Steinlechner, S. von Hoersten, T. Karl, "Stress-induced hyperthermia in the rat: comparison of classical and novel recording methods," *Lab.Anim.*, vol. 40, pp. 186-193, 2006.
- [6] J. A. D'Andrea, R. Y. Emmerson, C. M. Bailey, R. G. Olsen and O. P. Gandhi, "Microwave Radiation Absorption in the Rat: Frequency-Dependent SAR Distribution in Body and Tail," *Bioelectromagnetics*, vol. 6, no. 2, pp. 199-206, 1985.
- [7] J. I. Morgan, T. Curran, "Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and Jun," *Rev. Neurosci.*, vol. 14, 421-451, 1991.
- [8] E. López Martín, J. C. Brégains, F. J. Sebastián Franco, E. Moreno Piquero, F. Ares Pena, "An experimental set-up for measurement of the power absorbed from 900 MHz GSM standing waves by small animals, illustrated by application to picrotoxin-treated rats," *Progress in electromagnetic research PIERS*, vol. 87, pp.149-165, 2008.
- [9] J. C. Brégains, E. López Martín, F. J. Jorge Barreiro, J. L. Sebastián Franco, E. Moreno Piquero, F. Ares Pena, "Estudio de los efectos de la radiación en el cerebro de ratas expuestas en una cavidad GTEM a 900 y 1800 MHz," URSI-2008.
- [10] D. D. Bae, P. L. Brow, E. A. Kiyatkin, "Procedure of rectal temperature measurement affects brain, muscle, skin and body temperatures and modulates the effects of intravenous cocaine," *Brain research*, vol. 1154, pp. 61-70, 2007.
- [11] J. Kononen, J. Honkanieemi, H. Alho, J. Koistinaho, M. Iaradola, M. Pelto-Huikko, "Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress," *Endocrinology*, vol. 130, pp. 3041-3047, 1992.
- [12] A. Bratincsák, M. Palkovits, "Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure," *Neuroscience*, vol. 127, no. 2, pp. 385-97, 2004.