

Validación del protocolo experimental de radiación para la línea celular RAW 264.7 con frecuencias combinadas en cámara GTEM

Alberto López Furelos⁽¹⁾, José Manuel Leiro Vidal⁽²⁾, Aarón Ángel Salas Sánchez⁽³⁾, Juan Antonio Rodríguez González, ⁽³⁾Francisco José Ares Pena⁽³⁾, María Elena López Martín⁽¹⁾.
alberto.lopez.furelos@rai.usc.es; josemanuel.leiro@usc.es; aaronangel.salas@usc.es; ja.rodriiguez@usc.es; francisco.ares@usc.es; melena.lopez.martin@usc.es

⁽¹⁾Dpto. de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela. 15782.

⁽²⁾Instituto de Análisis Alimentario. Universidad de Santiago de Compostela. 15782.

⁽³⁾Dpto. de Física Aplicada. Universidad de Santiago de Compostela. 15782.

Abstract- The objective of this study is to investigate the effects of multiple signal electromagnetic fields in RAW 264.7 cells at 900 and 2450 MHz and their combination. Induction of heat shock proteins HSP 70 and TNF α in response to stress due to electromagnetic field source may suggest that they shift cellular equilibrium towards survival or initiating alterations in cell physiology.

To carry out this experimental study *in vitro* RAW cells were performed according to the following experimental scheme: **Group I: Irradiation at 900MHz ($P_{TR} = 12W$). Group II: Irradiation at 2450MHz ($P_{TR} = 12W$). Group III: Simultaneous irradiation at 900MHz ($P_{TR} = 6W$) and 2450MHz ($P_{TR} = 6W$). In addition, one control group was included in the study: Group IV was not irradiated.**

The experimental system comprised a GTEM (Gigahertz Transverse Electromagnetic) chamber connected to two vector signal generators, a signal mixer and amplifier, a directional coupler, a spectrum analyzer and a power meter. In order to maintaining the cells at a constant temperature of 37 degrees it is designed a heating device that enables an automated temperature control during the radiation exposure time.

I. INTRODUCCIÓN

El objetivo de esta investigación consiste en establecer un protocolo experimental en cultivos de células de mamíferos, para la exposición combinada de varias frecuencias en una cámara de ensayos electromagnéticos GTEM. La cavidad GTEM constituye un sistema de exposición que combina características tales como la generación de campo eléctrico cuasi-uniforme y el blindaje de los campos electromagnéticos (CEM) desde el exterior operando en una banda de frecuencias ancha. Además permite caracterizar las condiciones de exposición y proporciona un volumen interior para colocar las muestras biológicas de prueba [1]. Previamente hemos definido las condiciones de exposición combinada de frecuencias y el protocolo experimental utilizando esta misma cámara con animales pequeños, ratas Sprague-Dawley, y hemos obtenido resultados reproducibles [2].

En la vida real los seres vivos están sometidos a la interacción de múltiples señales de CEM (campos electromagnéticos) sin embargo hay escasos estudios experimentales que describan efectos biológicos *in vivo* o *in vitro* utilizando sistemas de exposición combinada de

radiación. Se han descrito modificaciones en los niveles de estrés térmico (HSP) en el cerebro [3] sin efectos detectables en la función testicular [4] o en el sistema inmune en estudios en animales [5]. Igualmente hay un número escaso de estudios de efectos biológicos de exposición combinada de radiofrecuencias en cultivos celulares [6,7].

Los experimentos que se llevan a cabo dentro de la GTEM, u otro tipo de dispositivos de radiación de CEM, para la aplicación de líneas celulares en cultivo, se enfrentan al problema crucial de mantener las células en las condiciones físicas adecuadas [8].

La línea celular de macrófagos RAW 264.7 se ha empleado de forma óptima para explorar la respuesta inmunitaria mediante aplicación CEM en GTEM [9]. La determinación posteriormente a la radiación de TNF o proteínas de estrés térmico permite evaluar la función y la viabilidad de los macrófagos [10]. Hasta la fecha, la bibliografía existente no indica que se hayan realizado estudios de los efectos de varias radiofrecuencias combinadas sobre mediadores proinflamatorios de la respuesta inmunitaria innata celular.

En este trabajo se ha estudiado en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 los efectos de la radiación combinada de varias frecuencias, durante 4 ó 24hs en una cámara GTEM. Tras la exposición controlada con una o varias radiofrecuencias se analizaron mediante biomarcadores las funciones citoprotectora (HSP70) e inflamatoria (TNF) de la RAW 264.7.

II. METODOLOGÍA

A. Descripción del sistema experimental de radiación

En la Fig. 1 se observa el sistema experimental. Se disponen dos Generadores de Señales Vectoriales (VSG1 y VSG2) que generan una señal sinusoidal pura de 900 MHz y 2450 MHz, respectivamente, regulada a la potencia requerida durante la irradiación. La salida procedente de ambos generadores se conecta a un Mezclador de Señales (SM) para pasar la señal al Amplificador (AMP). Una vez la señal es amplificada, se introduce en el Acoplador Direccional (DC) para pasarla directamente a la Cámara de Radiación GTEM en donde el frasco de cultivo (B), convenientemente

posicionado en la zona de máxima uniformidad de campo [1]. El DC permite medir los valores de potencia incidente P_{IN} mediante el Medidor de Potencia (PM) pudiendo establecer de esta forma la potencia de entrada deseada al sistema. Además, es posible medir la potencia reflejada P_{REF} , monitorizando y obteniendo el valor mediante el Analizador de Espectro (SA).

Se observa que el campo incide sobre B en la dirección \mathbf{k} , con los vectores \mathbf{E} y \mathbf{H} posicionados perpendicularmente a la dirección de propagación. Se utiliza la Sonda Isotrópica (IP) que nos proporciona el valor del módulo del campo eléctrico. Esta medida se realiza sin colocar el frasco de cultivo en el interior de la cámara y usando los valores deseados en las señales de entrada. De esta forma podemos precisar el comportamiento de la cámara en la zona de medida.

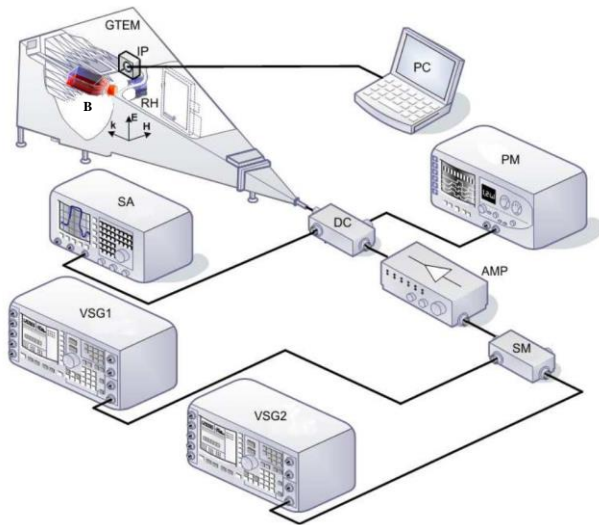


Fig.1. Esquema del sistema utilizado. GTEM: Cámara GTEM Schaffner 250; VSG1: Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4GHz) operando a 2,45 GHz; VSG2: Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4GHz) operando a 900 MHz; AMP: Amplificador Aethercomm 0,8-3,2-10; DC: Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz); SA: Analizador de Espectro Agilent E4407B (9KHz-26,5GHz); MP: Medidor de Potencia Agilent E4418B; SM: Mezclador de Señales Agilent 11636A; IP: Sonda Isotrópica de medidas.

Además, se ha comprobado que los valores obtenidos con la IP concuerdan, en líneas generales, con los que recomienda el fabricante de la cámara, mediante la expresión:

$$E = \sqrt{Z_0 P_{TR} / (h^2 \zeta)} \quad (1)$$

siendo h la altura de la bóveda (septum) en la zona de exposición (posición de B), ver Fig. 1, P_{TR} la potencia de entrada en la GTEM ($= P_{IN} - P_{REF}$), $Z_0 = 50[\Omega]$ la impedancia de entrada de la GTEM, y ζ un coeficiente que depende del rizado del campo dentro de la zona de posicionamiento de B, considerado igual a 2. No obstante, se ha optado por usar los valores medidos con la IP para llevar a cabo un estudio de mayor precisión.

B. Mantenimiento de la temperatura

Para mantener una temperatura constante de 37 °C se diseñó un sistema de termoregulación automático. El sistema consta de dos piezas. En el interior de la cámara se sitúa un pedestal fabricado en PVC (Fig. 2, A) que contiene agua, un serpentín interno de plástico transfiere el calor al agua. Este serpentín está conectado mediante dos tubos a la unidad de

calentamiento externa (Fig. 2, B) que consta de: una resistencia calefactora, un serpentín conectado a un sistema de refrigeración por aire, un termostato que controla la temperatura, una bomba para recircular el líquido y un depósito de agua. Este sistema nos permite mantener una temperatura constante de $37,5 \pm 0,5$ °C en la superficie del pedestal, sobre la cual se deposita los frascos de cultivo (Fig.2).

C. Cultivo de la línea RAW 264.7

En este estudio se empleó la línea celular de macrófagos RAW 264.7 (derivada de la BALB/c de ratón, que fue

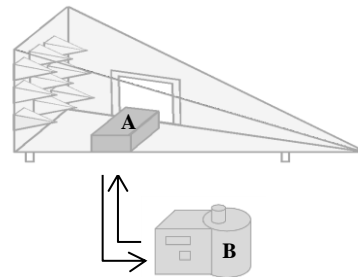


Fig2. Esquema del sistema de mantenimiento de la temperatura. Puede observarse el pedestal calefactado en el interior de la cavidad de radiación y el sistema calefactor externo.

adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC; cat. N TIB-71)), fue multiplicada en medio de cultivo L-15 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado (PAN Biotech) y se introdujeron las células en frascos de cultivo de 40ml (ThermoFisher scientific). En su preparación anterior a este experimento, el medio de cultivo fue renovado cada 2 días cuando las células se encontraban aun 90% del máximo de confluencia y fueron mantenidas en estufa en unas condiciones de 37°C en atmósfera húmeda

D. Exposición de la línea RAW 264.7

Para poder llevar a cabo este estudio experimental se expusieron 16 cultivos independientes de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 a la radiación de la cavidad GTEM. Se dividieron en dos núcleos experimentales atendiendo al tiempo de exposición, experimento I de 4 horas y experimento II de 24 horas y a su vez dividiéndolos en 4 grupos diferentes (2 cultivos celulares en cada grupo) de acuerdo al siguiente

• Diseño experimental:

Grupo I: Cultivos celulares irradiados a 900 MHz y 12W.

Grupo II: Cultivos celulares a 2450 MHz y 12W.

Grupo III: Cultivos celulares irradiados a 900MHz y 2450 MHz a una potencia de 6W respectiva y simultáneamente.

Grupo IV: Cultivos control no irradiados.

E. Detección de la expresión genética

• Extracción del mRNA

Después de la radiación, se procedió a centrifugar las células a 590 g durante 5 min. Se procedió a retirar el medio de cultivo L-15 y se resuspendió el pellet en 1 ml del reactivo TriPure (SIGMA-ALDRICH). A continuación se añadió 0,2 ml de cloroformo (Merck) y se dejó incubar 10 min tras los cuales se centrifugó a 1200g 15min y 4 °C. Se descartó la

fase que contenía el DNA, proteínas y restos celulares y se continuo tratando la fracción que contenía el RNA. Para la eliminación de los restos del reactivo TriPure se realizó un paso de dos alcoholes empezando por el isopropil alcohol (Merck) y etanol de 70% (Merck), centrifugando después de cada lavado. El resultado fue de un pellet deshidratado blanquecino que se almacenó a -70°C.

Tiempo de exposición	Valores de E (V/m)		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
4 Horas	103	104	76,9
24 Horas	96,5	100	68,8

Tabla I. Valores de campo (E) experimentales en la GTEM en la exposición de las células radiadas durante 4 horas y 24 horas.

• Tratamiento con DNasa

El pellet almacenado anteriormente se hidrató en con H₂O con Dietilpirocarbonato (SIGMA-ALDRICH) y dejó incubar durante 15 min a 60°C. Posteriormente se efectuó la cuantificación del RNA usando el equipo NanoDrop ND-1000 y se añadió 4 µg de ácidos nucleicos. Para el tratamiento con DNasa se utilizó el kit comercial (ThermoFisher scientific) consistente en DNasaI y tampón de reacción con 2,5 mM MgCl₂, tras incubar durante 30 min a 37°C la acción de la encima se detuvo con EDTA 50mM también presente en el kit.

• Real-Time PCR

De la muestra de RNA puro, se toman 200ng y se añaden los 1.25 µM *random hexamer primers* (Roche) y 250 µM deoxinucleosidos trifosfato (dNTPs) se dejan incubar a 65°C durante 5 min. A continuación se añaden más reactivos pertenecientes al kit GeneAmp® RNA PCR (ThermoFisher scientific) que consta de 200U de MMLV (Moloney murine leukemia virus) reverso transcriptasa (Promega) en buffer de reacción 30 mM Tris and 20 mM KCl (pH 8,3) e inhibidor de la ribonucleasa. A continuación se introducen en un termociclador y se selecciona el siguiente programa: 25 °C 5min, 37 °C 50 min y 70 °C 15 min. Como resultado obtenemos el cDNA del mRNA total.

• Q-PCR

Una vez se sintetiza el cDNA, procedemos a realizar la PCR cuantitativa en la cual realizamos el estudio de la expresión de los genes de factor de necrosis tumoral α (TNFα):

forward/reverse primer

5'-AGCCCCCAGTCTGTATCCTT-3'/

5'-CTCCCTTTGCAGAACTCAGG-3',

y la chaperona HSP70:

forward/reverse primer pair

5'-CATCATCAATGAGCCACAG-3'/

5'-TCTTGTGTTTGCCTTGAAC-3

usando en cada caso la β-actina:

forward/reverse primer pair

5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'/

5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGA-3'.

La ACT fue usada para comparar los datos ya que la expresión de esta no se ve modulada por la radiación. Cada muestra fue introducida por triplicado en una placa multipocillo y en cada pocillo fue introducido los *primer*

forward y *reverse* del gen de interés en cada caso además de la muestra cDNA a analizar así como el cromógeno *kapa sybr fast (kapa biosystems)*. La amplificación se realizó en el equipo EcoTM (Illumina).

III. RESULTADOS

A. Descripción de los parámetros experimentales de radiación

Los valores de campo eléctrico usados durante la realización de este estudio fueron medidos experimentalmente mediante una sonda isotrópica de campo eléctrico y se muestran en la tabla I.

Grupos experimentales	N° DE CICLO EN EL QUE SE DETECTO LA AMPLIFICACIÓN			
	Exposición de 4 horas		Exposición de 4 horas	
	TNF	β-actina	HSP70	β-actina
Grupo I	20,77±77×10 ⁻²	20,14±15×10 ⁻¹	31,68±40×10 ⁻² *	18,93±72×10 ⁻²
Grupo II	22,44±16×10 ⁻¹ *	26,28±73×10 ⁻¹	32,70±14×10 ⁻¹ *	22,10±92×10 ⁻¹
Grupo III	21,32±51×10 ⁻² *	17,65±52×10 ⁻²	32,24±59×10 ⁻² *	17,71±60×10 ⁻²
Grupo IV	23,83±26×10 ⁻²	20,83±12×10 ⁻¹	30,83±13×10 ⁻¹ *	17,30±13×10 ⁻¹

Tabla II. Numero de ciclo en el cual se detectó la amplificación. Las muestras fueron radiadas 4horas. * Indica las diferencias significativas del TNF y/o HSP70 respecto a la β-actina después de la radiación.

B. Resultados de la PCR cuantitativa

El análisis estadístico de los resultados de la PCR se realizó mediante un ANOVA de dos vías considerando dos factores: Radiación (grupos radiados/ no radiados (I-IV)) x Número de ciclos TNF o HSP-70 en relación a la Actina.

En el experimento I en el que se radiaron las células RAW 264.7 durante 4 horas se encontraron diferencias significativas en la expresión del TNF en el grupo II que aparece incrementada y en el grupo III disminuida respecto a la expresión de la β-actina. Aparecen diferencias significativas respecto al grupo IV o control solo en la β-actina en el grupo III.

Hay una disminución de la expresión de HSP70 que presenta diferencias significativas en todos los grupos respecto a la β-actina ($p < 0,001$).

En el experimento II en el que se radiaron las células RAW 264.7 durante 24 h se encontró que el TNF y HSP70 tenían una expresión disminuida en todos los grupos respecto a la β-actina ($p = < 0,001$) y respecto al control o grupo IV ($p = < 0,001$).

Grupos experimentales	N° DE CICLO EN EL QUE SE DETECTO LA AMPLIFICACIÓN			
	Exposición de 24 horas		Exposición de 24 horas	
	TNF	β-actina	HSP70	β-actina
Grupo I	23,80±25x10 ⁻² *#	18,32±26x10 ⁻²	23,85±20x10 ⁻¹ *#	19,90±13x10 ⁻¹
Grupo II	22,17±25x10 ⁻² *#	16,95± 36x10 ⁻²	22,47±33x10 ⁻¹ *#	17,57±42x10 ⁻²
Grupo III	23,94±17x10 ⁻² *#	18,59±20x10 ⁻²	32,45±24x10 ⁻¹ *#	18,82±23x10 ⁻²
Grupo IV	25,83±70x10 ⁻² *	19,49±12x10 ⁻¹	28,50±95x10 ⁻²	19,34±11x10 ⁻¹

Tabla III. Número de ciclo en el cual se detectó la amplificación. Las muestras fueron radiadas 24horas. * Indica las diferencias significativas del TNF y/o HSP70 respecto a la β-actina después de la radiación. #Indica diferencias después de la radiación respecto al grupo IV no radiado

IV. CONCLUSIONES

1. Se ha validado un sistema experimental de radiación combinada de varias frecuencias para cultivos en una cámara GTEM.

2. Los resultados de la PCR indicaron que la función de los macrófagos se modula según el tiempo de radiación de la línea celular RAW 264.7:

a- La capacidad inflamatoria de los macrófagos se incrementa cuando se expone a una sola frecuencia de 2450 MHz y disminuye en el grupo de radiación combinada cuando se expone 4 horas. Con 24 horas de radiación disminuye su expresión en todos los grupos.

b- La capacidad citoprotectora de la HSP-70 disminuye en todos los grupos tanto en exposiciones de 4 y/o 24 horas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer la ayuda recibida de la asistencia técnica de Rafael Fuentes y Estefanía Otero.

REFERENCIAS

- [1] Schaffner Electrotest Gmbh, GTEM Test Cells, Datasheet 2005.
- [2] A. López-Furelos, M.M. Miñana-Maiques, J.M. Leiro-Vidal, J.A. Rodríguez-Gonzalez, F.J. Ares-Pena, and M.E. López-Martin, "An Experimental Multi-frequency System for Studying Dosimetry and Acute Effects on Cell and Nuclear Morphology in Rat Tissues," *PIER*, vol. 129, pp. 541-558, 2012.
- [3] A. López-Furelos., J.M. Leiro-Vidal, A.A. Salas-Sánchez, J.A. Rodríguez-González, F.J. Ares-Pena, M.E. López-Martín, "Multiple Simultaneous Exposures to Electromagnetic Signals Induce Changes in Heat Shock Proteins and Caspase 3 on the Rat Brain Hemispheres," *URSI AT-RASC 2015: Gran Canaria*, 2015.
- [4] H.J. Lee, Y.B. Jin, T.H. Kim, J.K. Pack, N. Kim, H.D. Choi, J.S. Lee, and Y.S. Lee, "The Effects of Simultaneous Combined Exposure to CDMA and WCDMA Electromagnetic Fields on Rat Testicular Function," *Bioelectromagnetics*, Vol. 33, No. 4, pp. 356-64, 2012.
- [5] Y.B. Jin, B.J. Pyun, H. Jin, H.D. Choi, J.K. Pack, N. Kim, Y.S. Lee, "Effects of simultaneous combined exposure to CDMA and WCDMA electromagnetic field on immune functions in rats," *Int J Radiat Biol*, Vol. 88, No. 11, pp. 814-21, 2012.
- [6] K.A. Kang, H.C. Lee, J.J. Lee, M.N. Hong, M.J. Park, Y.S. Lee, H.D. Choi, N. Kim, Y.G. Ko, J.S. Lee, "Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells," *J Radiat Res*, Vol. 55, No. 2, pp. 265-76, 2014.
- [7] H.N. Kim, N.K. Han, M.N. Hong, S.G. Chi, Y.S. Lee, T. Kim, J.K. Pack, H.D. Choi, N. Kim, J.S. Lee, "Analysis of the cellular stress response in MCF10A cells exposed to combined radio frequency radiation," *J Radiat Res*, Vol. 53, No. 2, pp.176-83, 2012.
- [8] R.N. Pérez-Bruzón, A. del Moral, C. Pérez-Castejón, M. Llorente, A. Vera and M.J. Azanza. "Validation of an original incubator set-up for the exposure of human astrocyte cells to X-band microwaves in a GTEM-chamber," *Histol Histopathol*, Vol 26, pp. 1187-1196, 2011.
- [9] H.Y. Lin and Y.J. Lin, "In vitro effects of low frequency electromagnetic fields on osteoblast proliferation and maturation in an inflammatory environment," *Bioelectromagnetics*, Vol. 32, No. 7, pp. 552-560, 2011.
- [10] M. Sartori Grunwald, A. Simões Pires, A. Zanotto-Filho, J. Gasparotto, D. Pens Gelain, D. Ribeiro Demartini, C.M. Schöler, P.I. de Bittencourt Jr, J.C. Fonseca Moreira, "The oxidation of HSP70 is associated with functional impairment and lack of stimulatory capacity," *Cell Stress Chaperones*, Vol. 19, No. 6, pp. 913-925, 2014.