

Dosimetría y efectos biológicos en el cerebro de rata por exposición multifrecuencia en una 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@rai.usc.es; ja.rodriguez@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- Multiple simultaneous exposures to electromagnetic signals induce adjustments at the brain in the mammals. In this study we investigated the non-thermal SAR (Specific Absorption Rate) for *in vivo* rats exposed to multiple electromagnetic (EM) field signals at 900 and 2450 MHz and 2 W of power.

The 1g mean SAR values on brain and whole body of the rat were estimated from experimental power measurements, with the aid of an FDTD software tool. After radiation, we use the Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) technique, we studied cellular stress levels of heat shock protein (HSP) 70 and pre-apoptotic activity caspase-3-dependent on brain. Twenty-four hours after irradiation, the levels given protein HSP 70 and caspase-3 in animals exposed to one or more frequencies showed significant differences in both hemispheres (right and left) on the cerebral cortex animals. Multifrequency radiation causes acute changes on the brain.

I. INTRODUCCIÓN

Los campos electromagnéticos (EMF) pueden actuar como inductores de estrés celular y desencadenar la síntesis de proteínas de estrés térmico (HSP) que desempeñan una función citoprotectora [1,2]. Este incremento tisular de HSPs se asocia con una resistencia o disminución de apoptosis (muerte celular programada) [3].

La HSP-70 es una de las principales proteínas inducida por el estrés en el sistema nervioso, y tiene un papel neuroprotector que se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* [4]. Recientes estudios indican que la exposición a microondas pueden inducir apoptosis de las células nerviosas con incremento de la caspasa-3 por activación pre-apoptótica de la vía mitocondrial caspasa-dependiente [5]. Los efectos biológicos descritos están relacionados con el tiempo, frecuencia e intensidad de EMF [6]. Sin embargo hay escasos estudios que den información sobre los cambios tisulares que se producen tras la interacción simultánea de varias fuentes electromagnéticas. Recientemente tanto en nuestro laboratorio y como otros autores al estudiar diferentes marcadores biológicos no se han encontrado indicios de toxicidad tisular (en 8 tejidos) tras la interacción simultánea de varias radiofrecuencias [7,8].

Se sabe que el tejido cerebral de los mamíferos es sensible a la exposición de los campos electromagnéticos, sin embargo se conoce muy poco de cómo afecta al sistema nervioso de los seres vivos la interacción con varias fuentes

de radiación no ionizante. En este trabajo se expone la cabeza de ratas Sprague-Dawley a un sistema experimental de radiación que presenta una interacción simultánea de varias radiofrecuencias. Se han obtenido valores de SAR en el cerebro y en el cuerpo del animal mediante software comercial que utiliza la técnica FDTD [9]. Finalmente se analizan los efectos en el estrés celular mediante el estudio de la proteína HSP-70 y los niveles de actividad pre-apoptótica de la caspasa-3 en ambos hemisferios del tejido cerebral.

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 (GSV Frec #1 y GSV Frec #2) 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 (ME) para pasar la señal al Amplificador (AMP). Una vez la señal es amplificada, se introduce en el Acoplador Direccional (AD) para pasarla directamente a la Cámara de Radiación GTEM en donde se encuentra la rata R, convenientemente posicionada en la zona de máxima uniformidad de campo [10], e inmovilizada mediante el cepo de metacrilato CR. El AD permite medir los valores de potencia incidente P_{IN} mediante el Medidor de Potencia (MP) 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 (AE).

Se observa que el 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 R, respectivamente. Consecuentemente, la zona izquierda de R recibe la máxima intensidad de campo. Se utiliza la Sonda Isotrópica (SI) que nos proporciona el valor de pico del mismo. Esta medida se realiza sin colocar la rata 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. Este valor será utilizado posteriormente para conseguir realizar una simulación más objetiva de la cámara

GTEM, utilizando para ello tres frentes de ondas plana que reproducirán los datos obtenidos con la sonda.

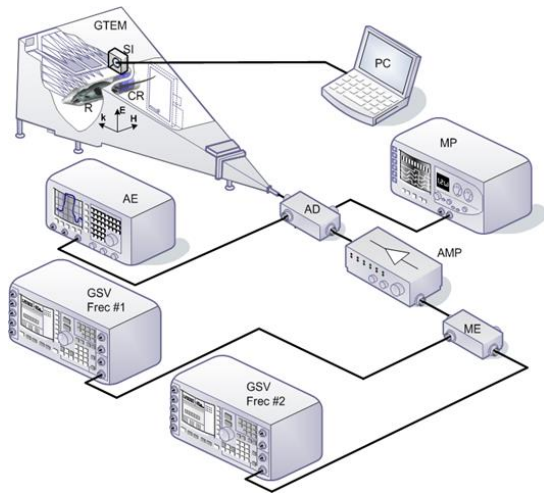


Fig. 1. Esquema del sistema utilizado. GTEM: Cámara GTEM Schaffner 250; GSV Frec #1: Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4GHz) funcionando a 2.45 GHz; GSV Frec #2: Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4GHz) funcionando a 900 MHz; AMP: Amplificador Aethercomm 0.8-3.2-10; AD: Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz); AE: Analizador de Espectro Agilent E4407B (9KHz-26,5GHz); MP: Medidor de Potencia Agilent E4418B; ME: Mezclador de Señales Agilent 11636A; CR: Cápsula Contenedora de la Rata Bajo Prueba; SI: Sonda Isotrópica de medidas. la cámara, comprobando la pureza espectral de la sinusoide.

Además, se ha comprobado que los valores obtenidos con la SI 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 la CR), 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 CR, considerado igual a 2. No obstante, se ha optado por usar los valores medidos con la SI para llevar a cabo un estudio de mayor precisión.

B. Descripción de la exposición de los animales

Para poder llevar a cabo este estudio experimental se expusieron 40 ratas a la radiación de la cavidad GTEM, dividiéndolas en 4 grupos diferentes (10 ratas en cada grupo), de acuerdo al siguiente esquema experimental:

- Grupo I: Animales irradiados a 900 MHz y 2W de potencia.
- Grupo II: Animales irradiados a 2450 MHz y 2W de potencia.
- Grupo III: Animales irradiados a 900MHz y 2450 MHz a una potencia de 1W respectiva y simultáneamente.
- Grupo IV: Animales control no irradiados.

Los animales, convenientemente inmovilizados mediante CR, (ver Fig.1), fueron irradiados individualmente durante 1 hora (Grupos I-III). En el Grupo IV se colocaron los animales igualmente en el CR el mismo tiempo sin ser sometidos a la radiación. Todos los animales se sacrificaron,

previa anestesia con pentotal, 24 horas después de la radiación.

C. Descripción de las simulaciones

Los valores de SAR se han estimado con la ayuda del SEMCAD X, 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), ensamblada en cortes de 1,15 mm (obtenidos con imágenes de resonancia magnética) y compuesta por 60 tejidos diferentes. El modelo numérico fue simulado con ondas planas incidiendo sobre la zona izquierda del animal, de tal forma que los campos simulados se correspondan con los medidos con la sonda isotrópica (SI). La onda plana más intensa es la que tiene el campo magnético \mathbf{H} paralelo a su eje principal (ver Fig.1). Las simulaciones (ejecutadas en un PC de escritorio con procesador Intel Core i7 a 3.2 GHz, 16 GB de RAM y tarjeta aceleradora de cálculo Nvidia Tesla C1060) se realizaron a 900 y 2450 MHz, con un mallado de 2.5 y 20,3 millones de celdas volumétricas, obteniéndose tiempos de cómputo de 20 y 35 minutos, respectivamente.

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:

$$SAR_E = SAR_S \times W_S / W_E \quad (2)$$

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.

D. Cambios en la temperatura rectal después de la exposición: niveles de estrés

La temperatura se midió con un termómetro digital (instrumentos Eutech). Las mediciones se realizaron en los siguientes momentos: antes de colocar al animal en la cámara de radiación e inmediatamente después de la exposición.

El seguimiento de la temperatura rectal de los animales en cada grupo (radiados y no radiados) nos ha permitido determinar los cambios temporales en la temperatura corporal, así como las diferencias en las respuestas entre los animales de experimentación.

E. Detección de proteínas

• Extracción de tejido

Después de la radiación se dejaron pasar 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 estos tiempos se procedió a la extracción de los 8 tejidos bajo una lupa Nikon Eclipse CFI60 tras anestesiarse al animal profundamente con éter etílico y se procede al sacrificio de los animales posteriormente. Una vez extraídos los tejidos se almacenaron a 30°C para su uso.

• ELISA

Una vez que se ha extraído el tejido conservado a -30°C se introdujeron en 0.5 ml de tampón inhibidor de proteasas compuesto de PBS, inhibidor PMFS 1 molar y EDTA 100 μ m y se disgregaron mediante sonicación.

Posteriormente se efectuó la cuantificación de la proteína en los extractos de cada muestra utilizando el kit Bio-Rad Protein Assa y (BioRadLaboratories) utilizando como proteína estándar sero albúmina bovina (BSA). Se añadió 1 μg de cada muestra a cada pocillo de alta adherencia, agrupados en tiras para ELISA de 8 pocillos (Greiner bio-one, german) y se incubó durante toda la noche a 4°C con 100 μl /pocillo de tampón de acoplamiento (Na_2CO_3 0,015 M, HNaCO_3 0,035 M, pH 9,6). A continuación, las placas fueron bloqueadas durante 2 h a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo compuesto de Tris salino (TBS; Tris 50 mM, NaCl 0,15M, pH 7,2) conteniendo un 0,2% de Tween 20 y un 5% de leche descremada. Tras un lavado con PBS se adicionó a las placas una dilución 1/200 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa-3 y anticuerpo monoclonal de conejo anti-HSP70 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó durante toda la noche a 4°C . Tras varios lavados con TBS, se adicionó una dilución 1/1000 de un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de ratón para el anticuerpo anti-Caspasa-3 y un con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Igs de conejo para el anticuerpos anti-HSP70 (Dako) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en un orbital vortex mixer (StuarT, England) a 650 rpm. Finalmente, las placas se lavaron con TBS y se revelaron mediante el kit comercial pierce ECL Werten Blotting substrate (Thermo) para luminiscencia consistente en una mezcla de Luminol y de H_2O_2 . La placa de ELISA se leyó a los 3 min de incubación en un Espectrofotómetro FLx800 (Biotek) y los resultados obtenidos se expresaron en RLU. Finalmente se realizó un análisis estadístico de los resultados.

Los resultados que aparecen en el texto y las figuras se expresan como la media y el error estándar de la media ($p < 0.05$). Se aplicaron los siguientes test estadísticos: a) Un ANOVA de dos vías con las variables lado (derecho/izquierdo) y grupo de radiación (I-IV) para evaluar la concentración de proteínas HSP-70 y caspasa-3 en ambos hemisferios de la corteza cerebral de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak b) Un ANOVA de dos vías para el análisis de temperaturas rectales (interacción de 1 o varias frecuencias X variaciones antes/después de la radiación).

III. RESULTADOS

A. Descripción del sistema experimental de radiación

Se expusieron a la radiación los animales con una $P_{TR}=2$ [W], colocados en la posición de la bóveda con una variación entre partes izquierda y derecha del animal de $h_L=0,220$ [m] hasta $h_R=0,239$ [m], debido a las diferencias de altura por causa del septum en la GTEM. Por tanto los valores de intensidad de campo a ambos lados de la cabeza del animal presentarán diferencias. Estas diferencias pueden cuantificarse de manera cualitativa mediante la expresión (1). Los valores obtenidos son: para el lado izquierdo 32,14 [V/m] y para el lado derecho 29,59 [V/m].

Región Anatómica	SAR _S [W/kg]		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Cavidad cerebral	0,0911	0,0933	0,1154
Hemisferios cerebrales	0,0902	0,0749	0,1009

Tabla 1. Valores de SAR experimental para una rata de 198g estimados mediante simulación, en el cerebro de la rata.

Group	f [MHz]	P _{TR} [W]	E _m [V/m]	SAR _E [W/kg]	
				W _E [g]	Body
I	900	2	47,5	Min. 182,9	0,1587
				Max. 218,8	0,1898
				Avg. 198,7	0,1718
II	2450	2	40,2	Min. 198,1	0,0601
				Max. 243,7	0,0740
				Avg. 224,7	0,0683
III	900	1	34,4	Min. 153,4	0,0879
	2450	1		Max. 306,3	0,1755
				Avg. 230,8	0,1322

Tabla 2. Listado resumen de valores de SAR experimental estimados mediante simulación, ver ec. (2).

En la Tabla 1 se presentan los resultados de SAR_S relativo en el cuerpo del modelo numérico de rata para distintas zonas anatómicas de interés. En la Tabla 2 se presentan los resultados de SAR_E estimados, ver ec. (2), para los distintos grupos de animales radiados (Grupos I a III, ver Sección II.B).

Los valores de SAR_E en cerebro y cuerpo corresponden a los valores promediados espacialmente en 1 [g] de tejido.

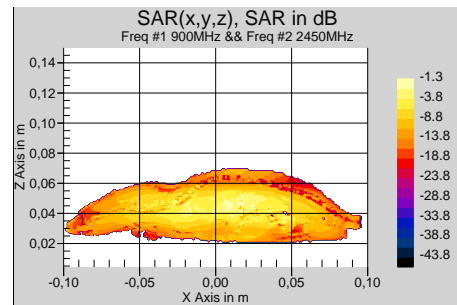


Fig. 2. Distribución del SARs en un corte vertical (plano principal $y=\text{constante}$), coincidente con el eje de la rata). Esta distribución es aplicable a la potencia establecida durante las experimentaciones. Escala en dB normalizada.

B. Resultados de la temperatura rectal

La medición de las temperaturas rectales indicó diferencias significativas después de la radiación entre los grupos III y IV ($p=0,025$).

Grupos experimentales	MEDICIÓN DE TEMPERATURAS RECTALES	
	Antes de la radiación	Después de la radiación
Grupo I	$37,560 \pm 18 \times 10^{-2}$	$36,698 \pm 4 \times 10^{-1}$
Grupo II	$37,125 \pm 15 \times 10^{-2}$	$37,012 \pm 16 \times 10^{-2}$
Grupo III	$37,427 \pm 9 \times 10^{-2}$	$37,493 \pm 2 \times 10^{-1}$ *
Grupo IV	$37,070 \pm 19 \times 10^{-2}$	$36,935 \pm 10 \times 10^{-2}$

Tabla 3. 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.

C. Resultados de ELISA

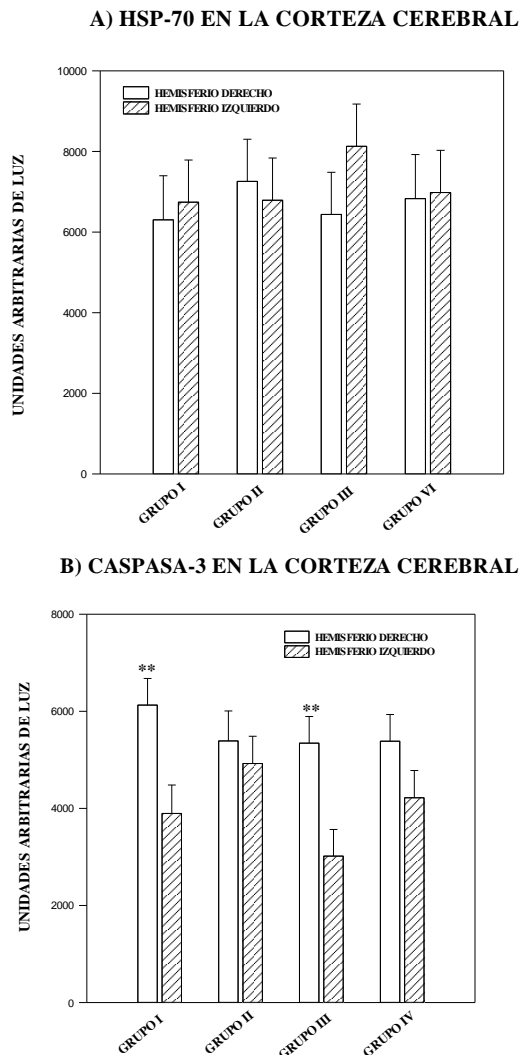


Figura 3. En la figura se muestran los histogramas de las medias y desviaciones estándar de los valores de luminiscencia de las proteínas A) HSP-70 y B) Caspasa-3, en el hemisferio derecho e izquierdo a nivel de la corteza cerebral; de los grupos radiados GI (900 MHz), GII (2,45 GHz), GIII (0,9+2,45 GHz) y GIV (control). Las diferencias significativas se indican * $P < 0,05$ ó ** $P < 0,01$.

El análisis estadístico de la proteína HSP-70 indica que no hay diferencias estadísticamente significativas en el nivel de proteína entre ambos hemisferios cerebrales ni tampoco entre los distintos grupos de animales radiados/no radiados. Sin embargo la concentración de caspasa-3 presentó diferencias significativas entre ambos hemisferios cerebrales ($p < 0,001$), derecho con menor intensidad de campo que el izquierdo, más próximo al generador y con mayor intensidad de campo. Los grupos I y III mostraron una disminución significativa ($p = 0,006$ y $p = 0,003$) de la concentración de la proteasa del lado izquierdo respecto al derecho.

IV. CONCLUSIONES

Los valores incrementados de estrés corporal y las modificaciones en las proteínas HSP-70 y caspasa-3 en el cerebro de los animales del grupo experimental III pueden dar indicios de alteraciones en la homeostasis del sistema nervioso.

Debe investigarse el efecto y consecuencias de la exposición repetida de varias radiofrecuencias en los seres vivos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad a través del proyecto TEC-2011-24441.

Los autores quieren agradecer la ayuda recibida de la asistencia técnica de Rafael Fuentes e Isabel Tarrío.

REFERENCIAS

- [1] M.T. Jorge-Mora, M. Alvarez-Folgueiras, J.M. Leiro-Vidal, F.J. Jorge-Barreiro, F.J. Ares-Pena, and M.E. López-Martin, "Exposure to 2.45GHz microwave radiation provokes cerebral changes in induction of HSP-90, heat shock protein in rats," *PIER*, vol. 100, pp. 351-379, 2010.
- [2] X.S. Yang, G.L. He, Y.T. Hao, Y. Xiao, C.H. Chen, G.B. Zhang, and Z.P. Yu, "Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields elicits an HSP-related stress response in rat hippocampus". *Brain Res. Bull.* 2012 Jul 1; 88(4):37.
- [3] M.J. Misa Agustíño, J.M. Leiro, M.T. Jorge Mora, J.A. Rodríguez-González, F.J. Jorge Barreiro, F.J. Ares-Pena, and M.E. López-Martín, "Electromagnetic fields at 2.45 GHz trigger changes in heat shock proteins 90 and 70 without altering apoptotic activity in rat thyroid gland". *Biol. Open.* 2012. 15;1 (9):831-8.
- [4] E. Calabrò, S. Condello, M. Currò, N. Ferlazzo, D. Caccamo, S. Magazù, and R. Ientile, "Modulation of heat shock protein response in SH-SY5Y by mobile phone microwaves". *World J. Biol. Chem.* 2012; 3(2):34-40.
- [5] Zuo H, Lin T, Wang D, Peng R, Wang S, Gao Y, Xu X, Li Y, Wang S, Zhao L, Wang L, and Zhou H, "Neural Cell Apoptosis Induced by Microwave Exposure Through Mitochondria-dependent Caspase-3 Pathway". *Int J Med Sci.* 2014; 11(5):426-35.
- [6] A. Campisi, M. Gulino, R. Acquaviva, P. Bellia, G. Raciti, R. Grasso, F. Musumeci, A. Vanella, and A. Triglia, "Reactive oxygen species levels and DNA fragmentation on astrocytes in primary culture after acute exposure to low intensity microwave electromagnetic field". *Neurosci. Lett.* 2010 31; 473(1):52-5.
- [7] A. López-Furelos, M. d 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.
- [8] 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*, 2011.
- [9] Schmid & Partner Engineering AG, "Reference manual for the SEMCAD simulation platform for electromagnetic compatibility, antenna design and dosimetry," 2009, www.semcad.com
- [10] Schaffner Electrotest GmbH, GTEM Test Cells, Datasheet 2005.