

EFECTO DE LA RADIOFRECUENCIA AGUDA Y REPETIDA A 2,45GHz EN LA MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES DE RATA

M. J. Misa Agustino⁽¹⁾, M. T. Jorge Mora⁽²⁾, F. J. Jorge Barreiro^(1,4), E. Moreno Piquero⁽³⁾, F. J. Ares Pena⁽³⁾, M. E. López Martín⁽⁴⁾

mari.misa@yahoo.es, maria.teresa.jorge.mora@sergas.es, fcojavier.jorge@usc.es, ja.rodriguez@usc.es, francisco.ares@usc.es, melena.lopez.martin@usc.es

⁽¹⁾ Servicio de Rehabilitación del CHUS, Complejo Hospitalario de la Universidad de Santiago de Compostela

⁽²⁾ Servicio de Rehabilitación del Complejo Hospitalario Universitario de Pontevedra. Universidad de Vigo.

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

⁽⁴⁾ Dpto. de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela.

Abstract- Non-ionizing radiation at 2.45 GHz may modify the morphology and expression of genes that codify heat shock proteins (HSP) in the thyroid gland. Fifty six rats were individually exposed once or repeatedly (ten times in 2 weeks) for 30 min to 2.45 GHz radiation in a Gigahertz transverse electromagnetic (GTEM) cell at different levels of non-thermal specific absorption rate (SAR), which was calculated using the finite difference time domain (FDTD) technique. Using the immunohistochemistry technique, we studied the expression of HSP-90 protein and morphological changes in tissues thyroid gland. Ninety minutes after the radiation of the central and peripheral follicles increased in size while the peripheral wall thickness suffered a decrease in size with the highest SAR exposure. Twenty four hours after radiation central and peripheral follicles decrease in size with the SAR of $0.4 \pm 12 \times 10^{-3}$. Likewise with repeated exposure showed a decrease in the size of the follicles (peripheral and central). Morphological changes in the thyroid gland after radiation indicate acute or repeated stress adaptation in thyroid tissue in the hypothalamic-thyroid.

I. INTRODUCCIÓN

En el escenario real de la vida diaria, las frecuencias de radio están asociadas con usos diversos como el industrial, médico, militar y muy frecuentemente con la comunicación. La radiación de microondas interacciona con el cuerpo, y en la actualidad se conoce muy poco acerca de los riesgos que puede tener en la de salud la exposición a diferentes fuentes electromagnéticas de naturaleza no térmica.

La glándula tiroides es uno de los órganos vitales más expuestos y que podría ser más vulnerable a la exposición a campos electromagnéticos (EMF) [1]. La exposición crónica a microondas con radiofrecuencia de 2450 MHz afecta significativamente al eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo provocando cambios en la temperatura del cuerpo, en el comportamiento y provoca modificaciones en la concentración de hormonas tiroideas [2]. La exposición crónica a frecuencias utilizadas en telefonía móvil como 900 MHz también ha determinado tanto en humanos como en animales alteraciones en los niveles hormonales de la TSH y hormonas tiroideas [3,4].

Recientemente hemos encontrado que la radiación aguda subérmica a 2,45 GHz puede alterar los niveles de estrés celular en el hipotálamo [5] y en la glándula tiroides de la rata sin alterar inicialmente la capacidad apoptótica [6]

En este estudio analizamos las modificaciones que tiene lugar en la morfología de la glándula tiroides mediante test inmunohistoquímico de la proteína de estrés HSP-90 a nivel del tejido tiroideo de rata después de la exposición aguda o repetida (diez veces en dos semanas) a radiofrecuencia a 2,45 GHz en un sistema experimental conectado a una cámara GTEM.

II. METODOLOGÍA

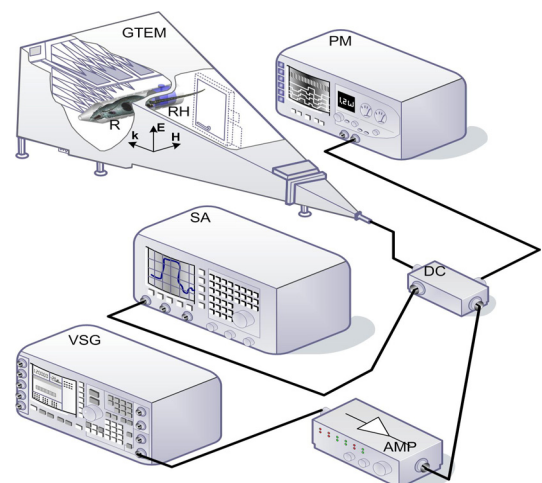


Fig. 1. Esquema del sistema de radiación microonda utilizado. GTEM: Cámara GTEM Schaffner 250; GSV Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4 GHz); AMP: Amplificador Aethercomm 0.8-3.2-10; Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz); AE: Analizador de Espectro Aligent E4407B (9KHZ-26,5 GHz); MP: Medidor de Potencia Aligent E4418B; CR: Cápsula Contenedor de la Rata Bajo Prueba; R: Rata.

A. 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 elementos que aparecen explicados en la figura 1. (GTEM) Cámara GTEM, (GSV) Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C(250 KHz-4 GHz) (AMP) Amplificador Aethercomm 0.8-3.2-10; Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz), (AE) Analizador de Espectro Aligent E4407B (9KHz-26,5 GHz); (MP) Medidor de Potencia Aligent E4418B, (CR) Cápsula Contenedor de la Rata Bajo Prueba; R: Rata.

La señal del Generador de Señales Vectorial (GSV) alimenta al amplificador AMP con una señal sinusoidal pura de 2450 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 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, 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:

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

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), $Z_0=50 [\Omega]$ 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 [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.

B. Diseño experimental

Se utilizaron un total de 56 ratas hembras Sprague – Dawley de un peso aproximado de 230-250 gr. Para su estudio se dividieron en los siguientes grupos:

- **Grupo A:** (N= 18) Animales con una exposición aguda de radiación y estudiados 90 minutos después de la radiación.
- **Grupo B:** (N= 18) Animales con una exposición aguda de radiación y estudiados 24 horas después.
- **Grupo C:** Animales son exposiciones repetidas una cada día durante 5 días a la semana y un total de 10 exposiciones.

Todos los animales se inmovilizaron durante la radiación que duró 30 minutos. En cada uno de estos grupos se hicieron animales control o no radiados que permanecieron el mismo tiempo en la cavidad.

C. Características de la exposición

En este trabajo se han radiado los animales durante 30 minutos a 2,45 GHz, en exposiciones únicas con 3 o 12 w de potencia o repetidas durante 10 veces en dos semanas a 3 watos, midiendo en cada caso la potencia absorbida por el animal.

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

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 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.1). El valor de campo E fue especificado por la ec. (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:

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

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.

E. Estudios Morfológicos

Una vez expuestos a la radiación los animales se sacrificaron con una dosis elevada de pentotal y se perfundieron por vía aorta ascendente con paraformaldehído a 4°. Posteriormente se extrajeron las glándulas tiroideas transfiriéndolo después de un intervalo de 90 m o 24 horas dependiendo del grupo y finalmente se sumergieron en un fijador compuesto por buffer fosfato y formaldehído al 10%.

Se realizaron cortes continuos de 5 μ m mediante un microtomo y se procesaron para inmunohistoquímica, Inicialmente se realizó preincubación de una hora en suero de caballo diluido al 10% en 0.02 M de KPBS tampón fosfato potásico salino con 0,25 o 0,30% de triton 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 triton X-100(1/500). Posteriormente tras varios lavados, se realizó incubación durante 90m a temperatura ambiente con antisuero secundario biotilado (1:200). Las secciones marcadas con biotina se lavaron y se

incubaron posteriormente otros 30m con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (DAKO) (1:100) en KPBS conteniendo 0,25% de triton. Finalmente se realizó el revelado e un 0,04% de peróxido de hidrógeno y 0,5% 3-3'diamino bencidina (DAKO).

F. Cuantificación

Los resultados de este trabajo se expresaron como media \pm error estándar de la media. Para analizar los resultados se aplicaron los siguientes test estadísticos: **a)** Un ANOVA de una vía para analizar, las diferencias causadas por la exposición en las tasas de absorción específicas de los animales a las distintas potencias; así como las diferencias estadísticas en los parámetros medidos en las glándulas tiroides en micrómetros entre animales radiados y no radiados a los 90 minutos, a las 24 horas para SAR con 3W o 12 w de potencia, en diámetro en folículo central (DMFC), diámetro en folículo periférico (DMFP), grosor en tabique central (GTC) y grosor en tabique periférico (GTP). **b)** Un ANOVA de dos vías para exposiciones repetidas, teniendo en cuenta como factores la Radiación \times Número de exposiciones. Con aplicación posterior del test de Tukey, Dunn o Bonferroni, HSD para comparaciones posteriores según el caso.

III. RESULTADOS

A. Tasa de Absorción específica (SAR)

Tabla 1. Valores de SAR en tiroides y cuerpos de las ratas experimentales calculados a partir de la potencia (P) y campo eléctrico (E). Los valores de SAR se obtuvieron mediante un test estadístico de un ANOVA de una vía teniendo en cuenta las distintas potencias y comparaciones *a posteriori* con el test de Dunn. Las diferencias son significativas a partir de $p < 0.05$.

	Media de SAR en Tiroides (W/kg)	Pico SAR en 1g de Tiroides	Media de SAR en el cuerpo (W/kg)	Pico SAR en 1g de cuerpo
EXPOSICIÓN AGUDA				
P= 3W E=40.28V/m	0.1 \pm 10.10 ⁻³	0.07 \pm 4.10 ⁻³	0.03 \pm 19.10 ⁻³	0.18 \pm 9.10 ⁻³
P=12W E=80.56V/m	0.4 \pm 12.10 ⁻³	0.3 \pm 10.10 ⁻³	0.16 \pm 4.10 ⁻³	0.8 \pm 2.10 ⁻³
EXPOSICIÓN REPETIDA				
P= Rep. 3W E=40.28V/m	0.1 \pm 6.10 ⁻³	0,08 \pm 14.10 ⁻⁴	0,03 \pm 7.10 ⁻³	0.18 \pm 3.10 ⁻³

La Tabla 1 muestra los valores promedio del SAR en el Tiroides y en el cuerpo de la rata así como los valores promedio del pico SAR por 1 gr en el tiroides y en el cuerpo, obtenido mediante medidas individuales de ratas expuestas a diferentes potencias(P) y campos eléctricos (E). No hay diferencias significativas en el SAR con una sola exposición a 3W y con exposiciones repetidas. El incremento de la media y el SAR máximo es directamente proporcional a la potencia inicial (P) y el campo eléctrico (E) generado en cada subgrupo.

B. Resultados Morfológicos

Animales de los Grupos A y B:

En los animales sometidos a exposiciones agudas de radiación (en los grupos A y B) los parámetros de morfometría medidos en el tejido de la glándula Tiroides determinaron modificaciones cuantificables en los diámetros de los

folículos centrales y periféricos del tiroides de las ratas radiadas con ambas potencias (3 y 12 watos) respecto a los animales no radiados. El grosor de los tabiques de tejido conectivo mostraron modificaciones transitorias a nivel periférico no a nivel central en los animales radiados. Los resultados de los análisis de los test estadísticos se muestran en las siguientes tablas:

Tablas 2 y 3. Valores medios \pm EEM en μ m del diámetro de folículos centrales (DMFC), diámetro de folículos periféricos (DMFP), Grosor de tabique Central (GTC) y Grosor de tabique periférico(GTP) 90 minutos y 24 hs respectivamente después de la exposición a radiofrecuencia de 2,45 GHz y 3 w de potencia.

		90m post-exposición		
		no radiado	radiado	
Parámetros (μ m)	N			P valor*
DMFC	28	53 \pm 5	83 \pm 4	0,010
DMFP	16	105 \pm 4	130 \pm 6	0,010
GTC	28	22 \pm 10	23 \pm 2	0,497
GTP	28	39 \pm 10	18 \pm 2	0,013

		24hs post-exposición		
		no radiado	radiado	
Parámetros (μ m)	N			P valor*
DMFC	28	86 \pm 5	70 \pm 2	0,007
DMFP	16	126 \pm 8	119 \pm 7	0,534
GTC	28	26 \pm 2	22 \pm 2	0,157
GTP	28	39 \pm 10	18 \pm 2	0,433

Tabla 4 y 5. Valores medios \pm EEM en μ m del diámetro de folículos centrales (DMFC), diámetro de folículos periféricos (DMFP), Grosor de tabique Central (GTC) y Grosor de tabique periférico (GTP) 90 minutos y 24 hs respectivamente después de la exposición a radiofrecuencia de 2,45 GHz y 12 w de potencia.

		90m post-exposición		
		no radiado	radiado	
Parámetros (μ m)	N			P valor*
DMFC	16	53 \pm 5	78 \pm 4	0,0010
DMFP	16	105 \pm 4	129 \pm 6	0,024
GTC	30	22 \pm 10	22 \pm 8	0,497
GTP	16	38 \pm 10	13 \pm 2	0,001

		24hs post-exposición		
		no radiado	radiado	
Parámetros (μ m)	N			P valor*
DMFC	16	89 \pm 5	75 \pm 3	0,045
DMFP	16	126 \pm 8	159 \pm 10	0,017
GTC	30	26 \pm 2	28 \pm 2	0,65
GTP	16	20 \pm 2	18 \pm 2	0,433

Animales del grupo C:

Los resultados obtenidos de las mediciones en el tejido tiroideo determinaron un menor tamaño de los folículos centrales y periféricos sometidos a exposición repetida en relación a los animales sometidos a una única exposición aguda con un nivel similar de SAR. Sin embargo el grosor de los tabiques no parece modificarse en los animales con exposiciones repetidas. Los resultados de los análisis estadísticos con un ANOVA de dos vías teniendo en cuenta los factores, radiación x número de exposiciones se muestran en los siguientes histogramas:

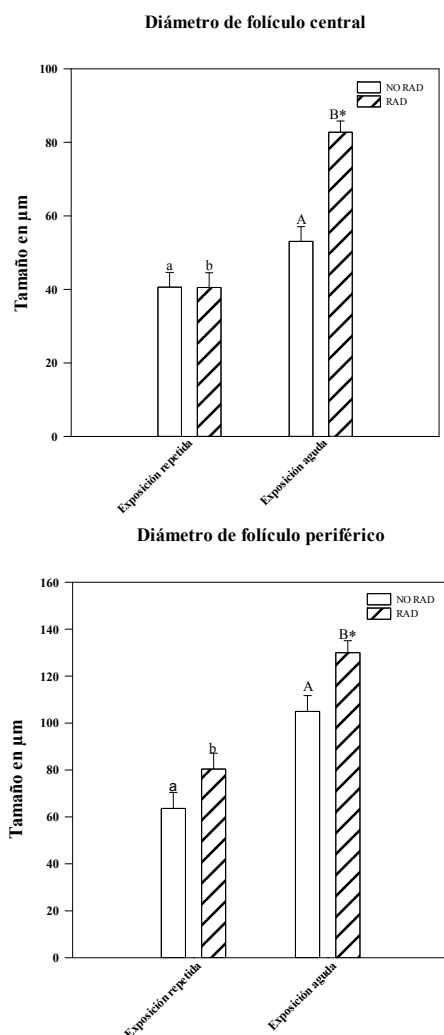


Fig. 2. Los histogramas I y II muestran los valores medios \pm EEM en μm del diámetro de folículos centrales (DMFC), diámetro de folículos periféricos (DMFP). * indica las diferencias estadísticas entre radiados/no radiados y las letras a, b indican las diferencias estadísticas entre exposiciones repetidas y exposiciones agudas.

IV. CONCLUSIONES

Los cambios en la morfología de la glándula tiroidea a la exposición aguda o repetida indican que la radiación no ionizante a 2,45 GHz provoca estrés en el tejido tiroideo que induce reajustes en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo.

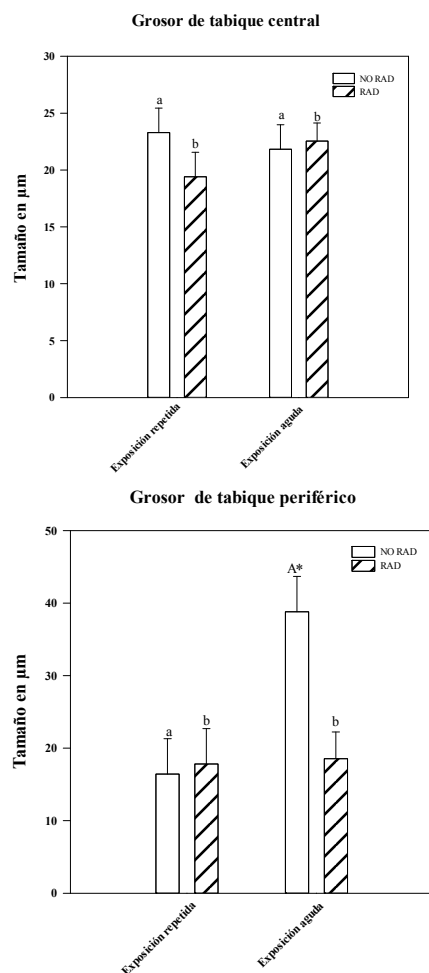


Fig. 3. Los histogramas III y IV muestran los valores medios \pm EEM en μm del grosor de tabique central (GTC), del grosor del tabique periférico (GTP). * indica las diferencias estadísticas entre radiados/no radiados y las letras a, b indican las diferencias estadísticas entre exposiciones repetidas y exposiciones agudas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección General de Investigación y desarrollo de la Xunta de Galicia por financiar parte de esta investigación con el proyecto de investigación 09TIC006206PR. Agradecemos la ayuda recibida de la asistencia técnica de Rafael Fuentes e Isabel Tarrío.

REFERENCIAS

- [1] R. K. Sinha, "Chronic non-thermal exposure of modulated 2450 MHz Microwave radiation alters thyroid hormones and behavior of male rats," *Int J. Radiat Biol.*, vol. 84, no. 6, pp. 505-513, 2008.
- [2] R. K. Sinha *et al.*, "Neural network-based evaluation of chronic non-thermal effects of modulated 2450 MHz microwave radiation on electroencephalogram," *Ann Biomed Eng.*, vol. 36, no. 5, pp. 839-51, 2008.
- [3] S. Mortavazi *et al.*, "Alterations in TSH and Thyroid hormones following mobile phone use," *Oman Medical Journal*, vol. 24, no. 4., 2009.
- [4] A. Koyu *et al.*, "Effects of 900MHz electromagnetic field on TSH and thyroid hormones in rats," *Toxicology Letters*, vol. 157, pp. 257-262, 2005.
- [5] T. Jorge-Mora *et al.*, "The effects of single and repeated exposure to 2.45 GHz radiofrequency fields on c-Fos protein expression in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus," *Neurochem Res.*, vol. 36 no. 12, pp. 2322-32, 2011.
- [6] M. J. Misa Agustino *et al.*, "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*, vol. 1, no 9, pp 831-838, 2012.