



Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina

Departamento de Ciencias Morfológicas

**ESTUDIO DE MARCADORES BIOLÓGICOS DE ESTRÉS
EN LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL TIMO DE RATA
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RADIACIÓN
SUBTÉRMINO A 2,45 GHz**

TESIS DOCTORAL

María José Misa Agustiño

Santiago de Compostela, abril de 2014

**ESTUDIO DE MARCADORES BIOLÓGICOS DE
ESTRÉS EN LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL
TIMO DE RATA EN UN MODELO EXPERIMENTAL
DE RADIACIÓN SUBTÉRMINO A 2,45 GHz**

Tesis Doctoral presentada por:

María José Misa Agustíño

Directores:

María Elena López Martín

Profesora titular de Anatomía Humana

Francisco Javier Jorge Barreiro

Catedrático de Anatomía Humana

Departamento de Ciencias Morfológicas

Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, 8 de abril de 2014

Dña. María Elena López Martín, Profesora Titular de Anatomía Humana y Don Francisco Javier Jorge Barreiro, Catedrático de Anatomía Humana del departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela

HACEN CONSTAR QUE:

Dña. María José Misa Agustiño ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral, **“ESTUDIO DE MARCADORES BIOLÓGICOS DE ESTRÉS EN LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL TIMO DE RATA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RADIACIÓN SUBTÉRMINICO A 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 8 de abril de 2014.

Prof. Dña. M^a Elena López Martín

Prof. D. Fco. Javier Jorge Barreiro

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento en primer lugar a mis directores de tesis, el profesor Francisco Javier Jorge Barreiro, quien desde mi etapa de formación en la especialidad de Medicina Física y Rehabilitación me ha transmitido su vocación por la docencia y la investigación, al que con el paso de los años más admiro por su capacidad profesional y sobre todo como persona. Y a la profesora María Elena López Martín quien me propuso la elaboración de esta tesis, agradecer su ayuda y colaboración a lo largo de estos años y por su estímulo constante y apoyo para poder llegar a finalizar este trabajo.

A Julio Bregains, Isabel Tarrío, Eva Domínguez, Eva García, Rafael Fuentes y José Carlos Santos, cuya colaboración ha sido muy importante en la parte experimental de esta tesis.

A los compañeros que componen el Departamento de Ciencias Morfológicas donde uno siempre se siente bien recibido.

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

A mis compañeros de Rehabilitación en especial a Teresa Jorge con la que he compartido momentos muy importantes en nuestras vidas, así como el inicio en la etapa de doctorado. Y a Bibiana que siempre está ahí para alentarte y darte ánimos, siempre haciéndote ver el lado positivo en todo.

A mi marido Fernando por su cariño, paciencia y colaboración incondicional.

A mis hijos Laura y Fernando que nacieron y crecieron durante la elaboración de esta tesis.

A mi madre que cambió su ritmo de vida por acompañarme y ayudarme en el cuidado de mi familia. Y a toda mi familia que siempre me han mostrado su apoyo y animado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Finalmente desearía expresar mi agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad por haber financiado esta investigación con el proyecto TEC-2011-24441.



“Empieza por hacer lo necesario, luego haz lo posible y pronto estarás logrando lo imposible”.

San Francisco de Asís



A mi familia

ÍNDICE

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	25
RESUMEN.....	31
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	35
1.1. CONTAMINACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.....	37
1.2. ASPECTOS BÁSICOS DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.....	38
1.2.1. Características de los campos electromagnéticos.....	38
1.2.2. Espectro de las ondas electromagnéticas.....	40
1.2.3. Interacción de los campos electromagnéticos con los tejidos biológicos: permitividad y conductividad.....	43
1.2.4. Unidades de medida de los campos electromagnéticos. Cuantificación del campo electromagnético en el tejido radiado. Cálculo de SAR.	45
1.2.5. Normativa relativa a los campos electromagnéticos.	46
1.2.6. Límites de la exposición a los campos electromagnéticos.	48
1.3. APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LA RADIACIÓN CON MICROONDAS EN MEDICINA FÍSICA Y REHABILITACIÓN.....	49
1.3.1. Diatermia electromagnética.....	50
1.3.2. Mecanismo de producción. Aparatos de microondas terapéuticas.	50
1.3.3. Bases físicas de la terapia con microondas.....	52
1.3.4. Dosificación de las microondas.....	54
1.3.5. Efectos fisiológicos conocidos de la aplicación de diatermia por microondas.	56
1.3.6. Indicaciones de la aplicación terapéutica con microondas en Medicina Física y Rehabilitación.....	57
1.3.7. Otras aplicaciones terapéuticas con microondas en medicina.....	58
1.3.8. Contraindicaciones de la aplicación terapéutica con microondas en Medicina Física y Rehabilitación.....	58
1.4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN NO IONIZANTE.....	59
1.4.1 Efectos de la radiación electromagnética de radiofrecuencia sobre los tejidos: Efectos térmicos, atérmicos y no térmicos.	59

1.4.2. Empleo de sistemas experimentales de radiación.....	60
1.4.3. Investigación de los efectos de los campos electromagnéticos en los seres vivos. Efectos sobre la glándula tiroides y el timo.....	61
1.4.3.1. Morfología y función de la glándula tiroides.....	61
1.4.3.2. Mecanismo de control de la secreción de hormonas tiroideas: Eje Hipotálamo-Hipófisis- Tiroides (H-H-T).....	64
1.4.3.3. Cambios en la glándula tiroides tras exposición a campos electromagnéticos.....	65
1.4.3.3.1. Cambios en la morfología a nivel de la glándula tiroides.....	65
1.4.3.3.2. Cambios en la secreción hormonal de la glándula tiroides.....	65
1.4.3.4. Morfología y función del timo.....	67
1.4.3.5. Cambios en el timo tras exposición a campos electromagnéticos.....	68
1.4.3.5.1. Cambios en la morfología del timo.....	68
1.4.3.5.2. Cambios en la secreción del timo. Alteraciones funcionales del timo.....	69
1.5. ESTUDIO DE PARÁMETROS PARA LA MEDIDA DE EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS.....	69
1.5.1. Determinación experimental de dosimetría (SAR) en sistemas de radiación.....	69
1.5.2. Marcadores de daño celular en tejidos biológicos.....	70
1.5.2.1. Proteínas de estrés térmico (HSP). Funciones de las proteínas de estrés térmico.....	70
1.5.2.1.1. Clasificación de las proteínas de estrés térmico.....	71
1.5.2.1.2. La proteína de estrés térmico 90 (Hsp90).....	71
1.5.2.1.2.1. Expresión de Hsp90 en tejido glandular en condiciones basales y bajo estrés.....	73
1.5.2.1.2.2. Expresión de Hsp70 en tejido glandular.....	74
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	75
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	77
2.2. OBJETIVOS.....	78
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
3.1. ANIMALES.....	83
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	83

3.2.1. EXPERIMENTO 1: Estudio de la expresión de Hsp-90 α/β y Hsp-70 y de la actividad apoptótica en la glándula tiroides de ratas expuestas a radiación con microondas a 2,45 GHz.....	83
3.2.2. EXPERIMENTO 2: Efecto de la radiofrecuencia aguda y repetida a 2,45 GHz en la morfología de la glándula tiroides de rata.....	85
3.2.3. EXPERIMENTO 3: Estudio de la radiofrecuencia aguda a 2,45 GHz en la expresión de las proteínas Hsp90 Y Hsp70 y en la morfología del timo de rata.....	87
3.3. RADIACIÓN CON MICROONDAS EN CAVIDAD EXPERIMENTAL (GIGAHERTZ TRANSVERSE ELECTROMAGNETIC: GTEM). CÁLCULO DE SAR.....	88
3.3.1. Descripción del sistema experimental de radiación.....	88
3.3.2. Descripción de las simulaciones y cálculo del SAR mediante SEMCAD.....	90
3.4. ESTUDIO DE LA DETERMINACIÓN TÉRMICA EXPERIMENTAL DURANTE LA RADIACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ESTRÉS.....	91
3.4.1. Cambios en la temperatura rectal después de la exposición: niveles de estrés.....	91
3.5. TÉCNICA GENERAL DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	92
3.5.1. Extracción de tejido.....	92
3.5.2. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).....	92
3.5.2.1. Determinación de la concentración de proteína.....	92
3.5.2.2. ELISA.....	92
3.6. TÉCNICAS GENERALES DE TINCIÓN E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	93
3.6.1. Perfusión y procesamiento del tejido.....	93
3.6.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E).....	93
3.6.3. Tinción de núcleos con DAPI.....	94
3.6.4. Inmunohistoquímica.....	94
3.6.4.1. Técnica general de inmunohistoquímica simple.....	94
3.7. MEDICIÓN DE PARÁMETROS HISTOLÓGICOS, CUANTIFICACIÓN Y ESTADÍSTICA:.....	95
3.7.1. EXPERIMENTO 1:.....	95
3.7.2. EXPERIMENTO 2:.....	95
3.7.3. EXPERIMENTO 3:.....	96

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
4.1. EXPERIMENTO 1.....	101
4.1.1. INTRODUCCIÓN.....	103
4.1.2. RESULTADOS.....	104
4.1.2.1. Resultados de SAR.....	104
4.1.2.2. Niveles de estrés y cambios en la temperatura rectal después de la exposición.....	105
4.1.2.3. Resultados de los niveles de proteínas Hsp90 y Hsp70 determinados por ELISA.....	108
4.1.2.3.1. Resultados de Hsp90.....	108
4.1.2.3.2. Resultados de Hsp70.....	109
4.1.2.4. Análisis con Hematoxilina y Eosina.....	111
4.1.2.5. Resultados de la Tinción con DAPI.....	112
4.1.3. DISCUSIÓN.....	113
4.2. EXPERIMENTO 2.....	119
4.2.1. INTRODUCCIÓN.....	121
4.2.2. RESULTADOS.....	122
4.2.2.1. Tasa de absorción específica (SAR).....	122
4.2.2.2. Estudio de morfología de la glándula tiroides.....	123
4.2.2.3. Resultados de los parámetros morfológicos medidos en la glándula tiroides.....	124
4.2.2.4. Distribución del marcaje inmunohistoquímico de la proteína Hsp90 en la glándula tiroides.....	131
4.2.3. DISCUSIÓN.....	135
4.3. EXPERIMENTO 3.....	141
4.3.1. INTRODUCCIÓN.....	143
4.3.2. RESULTADOS.....	144
4.3.2.1. Resultados de SAR.....	144
4.3.2.2. Cambios en la temperatura rectal postradiación: niveles de estrés.....	145
4.3.2.3. Niveles de proteínas Hsp90 y Hsp70 determinadas por ELISA.....	146
4.3.2.3.1. Resultados de la proteína Hsp90.....	146
4.3.2.3.2. Resultados de la proteína Hsp70.....	147
4.3.2.4. Resultados de la tinción con H-E.....	149
4.3.2.5. Resultados de la inmunohistoquímica de Hsp90.....	153
4.3.3. DISCUSIÓN.....	155

5. DISCUSIÓN GENERAL.....	159
5.1. OBTENCIÓN DE UN MODELO BIOLÓGICO EN ANIMALES PEQUEÑOS CON SAR SUBTÉRMINO Y BAJOS NIVELES DE ESTRÉS.....	162
5.2. BIOMARCADORES DE ESTRÉS CELULAR: EXPRESIÓN DE LAS PROTEINAS HSP90 Y HSP70 EN LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL TIMO DE RATA.	163
5.3. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL TIMO DE RATA TRAS EXPOSICIÓN A MICROONDAS.....	166
6. CONCLUSIONES.....	171
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
8. APENDICE: PUBLICACIONES	197





ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ESQUEMAS

Tablas:

Tabla 1. Intervalo de frecuencias correspondiente a las diferentes regiones del espectro electromagnético.	41
Tabla 2. Restricciones básicas para exposiciones a campos eléctricos y magnéticos para frecuencias entre 10 MHz y 10 GHz (ICNIRP, 1998).	48
Tabla 4. Coeficiente de reflexión para microondas de 2.450 MHz para diferentes tejidos determinados por Boin y Lotman.	54
Tabla 5. Clasificación de dosificación clínica de Schliephake.	55
Tabla 6. Efectos fisiológicos conocidos provocados localmente sobre tejidos con la aplicación de microondas.	56
Tabla 7. Principales indicaciones para la aplicación terapéutica de las microondas.	57
Tabla 8. Aplicaciones de microondas más recientes en medicina.	58
Tabla 9. Contraindicaciones para la aplicación de microondas.	58
Tabla 10. Principales funciones de las hormonas tiroideas.	64
Tabla 11. Funciones del Timo.	68
Tabla 12. Resumen de las principales familias de HSPs y su función principal (Katschinski, D.M., 2004).	71
Tabla 13. Isoformas mayores de la Hsp90, diferencias en la función y expresión (Sreedhar A.S., 2004).	72
Tabla 14. Distribución de los grupos y subgrupos en relación con la potencia de radiación y el tiempo post-exposición a microondas.	88
Tabla 15. Resultados experimentales de SAR en la glándula tiroides y en el cuerpo del animal calculados para los diferentes valores aplicados de potencia (P) y campo eléctrico (E).	105
Tabla 16. Mediciones experimentales de temperaturas rectales.	106
Tabla 17. 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 fueron comparados mediante un ANOVA de una vía para las diferencias entre potencia (P) o campo eléctrico (E) y comparaciones a posteriori con el test de Dunn. Para comparaciones múltiples, las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$	122
Tabla 18. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para diámetro de folículo central en tiroides. Radiación (Rad), Potencia (P), Tiempo postradiación (T)	127
Tabla 19. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para diámetro de folículo periférico en tiroides.	127
Tabla 21. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para Grosor de tabique periférico en tiroides.	128

Tabla 22. Valores medios± EEM en μm de los parámetros en la glándula tiroides: diámetro de folículos centrales (DFC), diámetro de folículos periféricos (DFP), grosor de tabique central (GTC) y grosor de tabique periférico (GTP) 90 minutos (90 min) y 24 horas (24 h) postexposición en animales no radiados (NO RAD) y radiados (RAD) a radiofrecuencia de 2,45 GHz y 3 W de potencia. ($p < 0,05$, ANOVA de 2 vías seguido de test de Tukey).	128
Tabla 23. Valores medios \pm EEM en μm de los parámetros en la glándula tiroides: diámetro de folículos centrales (DFC), diámetro de folículos periféricos (DFP), grosor de tabique central (GTC) y grosor de tabique periférico (GTP) 90 minutos (90 min) y 24 horas (24 h) postexposición en animales no radiados (NO RAD) y radiados (RAD) a radiofrecuencia de 2,45 GHz y 12 W de potencia. ($p < 0,05$, ANOVA de 2 vías seguido de test de Tukey).	128
Tabla 24. Valores del SAR en los timos y cuerpos de ratas experimentales calculados desde la potencia (P) y campo eléctrico (E). Expresados como Media \pm Error Estándar de la media (M \pm EEM) obtenidos del promedio del SAR y pico SAR de los animales. Los valores son comparados con un ANOVA de una vía cuyo factor de estudio es la potencia aplicada de radiación (0, 1,5, 3,12W). Seguido por un test de Holm-Sidak de comparaciones múltiples.	144
Tabla 25. Temperaturas rectales de ratas experimentales, expresadas como Media \pm Error Estándar de la media (M \pm EEM), obtenidas de los promedios de las temperaturas de los animales. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías, siendo los factores estudiados la Potencia aplicada (0, 1,5, 3, 12 vatios) X el Tiempo antes y después de la radiación (0, 90minutos y 24 horas).....	146
Tabla 26. Número de vasos en la medular del timo obtenidos como promedio del recuento en las secciones, teñidas con H-E y expresados como Media \pm Error Estándar de la media (M \pm EEM). Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la potencia aplicada (0, 1,5, 3,12 vatios) X el tiempo después de la exposición (90minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni.....	152
Tabla 27. Número de células reticuloepiteliales de aspecto hemorrágico en el timo, obtenidas como promedio del recuento en las secciones, teñidas con H-E y expresados como M \pm EEM. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la Potencia aplicada (0, 1,5, 3,12 vatios) X el Tiempo después de la exposición (90minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni.	152
Tabla 28. Número de glóbulos rojos en el timo obtenidos como promedio del recuento en las secciones, teñidos con H-E y expresados como M \pm EEM. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la Potencia aplicada (0, 1,5, 3, 12 vatios) X el Tiempo después de la exposición (90minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni.....	153
Tabla 29. Proporción del tamaño de la corteza respecto al de la médula del timo, obtenidos como promedio del recuento en las secciones, teñidos con H-E y expresados como M \pm EEM. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la Potencia aplicada (0, 1,5, 3,12 vatios) X el Tiempo después de la exposición (90minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni	153

Figuras:

Figura 1.	Representación esquemática de una onda electromagnética en forma de onda plana, polarizada en tres planos perpendiculares entre sí: onda magnética en rojo, onda eléctrica en azul y la punta de flecha indicando la dirección de propagación de la onda. Y representación de las referencias para medir la longitud de onda.	38
Figura 2.	Esquema del espectro electromagnético con la distribución de las frecuencias y las longitudes de onda.	40
Figura 3.	Relación entre permitividad y conductividad a nivel de tejidos biológicos: La permitividad (ϵ) y la conductividad (σ) eléctrica de un tejido disminuyen y aumentan respectivamente a medida que aumenta la frecuencia del campo eléctrico oscilante aplicado (Sebastián Franco J.L, 2006).	43
Figura 4.	(A) y (B) Magnetron de un aparato de microondas. Ánodo (A), Capa del cátodo (C) Campo magnético (H), Cátodo (K), Salida de frecuencias (S), Voltaje (V_o).	51
Figura 5.	Aparato de microondas terapéutica.	52
Figura 6.	Vista frontal de glándula tiroidea con forma de mariposa, localizada rodeando la cara anterior y lateral de la tráquea, por debajo del cartilago tiroidea.	61
Figura 7.	Tinción con Hematoxilina -Eosina en una muestra histológica de glándula tiroidea de rata, donde se indican los componentes principales del tejido tiroideo: (a) folículo, (b) coloide, (c) células foliculares, (d) células parafoliculares, (e) tejido conectivo. 20X.	62
Figura 8.	El timo localizado en el mediastino anterior. En el cuerpo humano se sitúa por delante de la tráquea, con morfología bilobulada.	67
Figura 9.	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.	90
Figura 10.	La distribución de SAR local en el fantomas de rata expuesto a (A) 1,5 W, (B) 3W y (C) 12W de 2,45 GHz, en el plano $X = 0,33$ m.	107
Figura 11.	Los histogramas representan los niveles de proteína Hsp90(A) y de proteína Hsp70 (B) detectados por ELISA en la glándula tiroidea después de aplicar distintas potencias 0, 1,5, 3 y 12 W, transcurridos 90 minutos y 24 horas después de la exposición. Cada barra representa los valores medios \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) empleando un ANOVA de dos vías y un test a posteriori de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.	110
Figura 12.	Las fotografías de tejido tiroideo de rata teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) no muestran signos de daño celular en ratas expuestas a 1,5 W (A) y 3 W (C) y una ligera pérdida de cohesión en las células foliculares a 12 W (E) en aumento a 40X. Las fotos B, D y F muestran las áreas marcadas con * en aumento a 100X. Las flechas indican las células foliculares, las puntas de flecha indican tejido desestructurado.	111
Figura 13.	Las fotografías de tejido tiroideo de rata con tinción fluorescente con DAPI no muestran evidencias de fragmentación nuclear o condensación de la cromatina en las células epiteliales de los folículos tiroideos en cada uno de los grupos	

experimentales. Las fotos (A) (B) (C): animales sacrificados 24 horas después de la exposición a 0 W (control), 1,5 W o 12 W, respectivamente; (D) (E) (F): animales sacrificados 90 minutos después de la exposición 0 W (control), 1,5 W o 12 W. Las flechas indican células foliculares sin signos de apoptosis en aumento a 100 X. 112

Figura 14. El dibujo muestra la representación de una preparación histológica con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E,) en la glándula tiroidea de rata. Están señaladas las áreas anatómicas medidas en las glándulas de ratas en todos los grupos estudiados, con exposición aguda (grupos A y B) y repetida (grupo C) y los controles correspondientes: foliculo (recuadro rojo), diámetro del foliculo central (DFC), diámetro del foliculo periférico (DFP) grosor del tabique central (GTC) y grosor del tabique periférico (GTP). Además se identifican, la membrana capsular (MC), coloide(C), célula folicular (CF) y célula parafolicular (CPF). 123

Figura 15. Los histogramas representan en μm (A) el diámetro de los folículos centrales (DFC) y (B) el diámetro de los folículos periféricos (DFP) en ratas no radiadas (NO RAD) y ratas radiadas (RAD) del grupo C con exposiciones repetidas y grupo A con exposiciones agudas. Cada barra representa el valor medio \pm EEM. Los * indican las diferencias estadísticas entre radiados/no radiados y las letras **a**, **b** indican las diferencias estadísticas entre exposiciones repetidas y exposiciones agudas ($p < 0,05$), ANOVA de dos vías y posteriormente test de Tukey. 129

Figura 16. Los histogramas representan en μm (A) el grosor de tabique central (GTC) y (B) el grosor del tabique periférico (GTP) en ratas no radiadas (NO RAD) y ratas radiadas (RAD) del grupo C con exposiciones repetidas y grupo A con exposiciones agudas. Cada barra representa el valor medio \pm EE. El * indica las diferencias estadísticas entre radiados/no radiados y las letras a, b indican las diferencias estadísticas entre exposiciones repetidas y exposiciones agudas. ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías y posteriormente test de Tukey). 130

Figura 17. Fotografías de tejido tiroideo de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, que muestran las diferencias de tamaño de los folículos periféricos, aumentando después de la exposición aguda. Las fotos A y B (grupo A): A, animales sacrificados a los 90 min de la exposición a 0 W (control) y B, a 3 W. Las fotos C y D (grupo B) corresponden a animales sacrificados 24 h después de la exposición a 0 W (control) y 12 W respectivamente. El asterisco indica el diámetro del foliculo periférico (DFP), las puntas de flecha indican la membrana capsular (MC), la flecha doble blanca el grosor del tabique periférico (GTP) de tejido conectivo. Aumento a 40X, barra de calibración 50 μm 132

Figura 18. Fotografías de tejido tiroideo de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, que muestran las diferencias de tamaño de los folículos periféricos, incrementada después de la exposición aguda y repetida. Las fotos A y B: A, animales sacrificados a los 90 min de la exposición a 0 W (control) y B, a 3 W. Las fotos C y D, animales sacrificados a los 90 min de finalizada la exposición (exposición iniciada 2 semanas antes) a 0W (control) y a 3 W. Los asteriscos indican el diámetro de los folículos periféricos (DFP), las puntas de flecha indican la membrana capsular (MC), la flecha doble blanca el grosor del tabique periférico (GTP) de tejido conectivo. Aumento a 40X, barra de calibración 50 μm 133

Figura 19. Las fotografías de tejido tiroideo de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, muestran las diferencias de expresión en las células parafoliculares de animales sacrificados a los 90 min de la exposición. La foto A exposición a 3 W y la C a 12 W con un aumento de 40X. Las fotos B y D a un aumento de 100X. Los asteriscos indican las células parafoliculares (CPF). Las barras de calibración (A, C)= 40 μm , (B, D)= 20 μm 134

Figura 20. Los histogramas representan los niveles de Hsp90 (A) y Hsp70 (B) detectados por ELISA en el timo 90 min y 24 h después de la exposición a 0, 1.5, 3 y 12 vatios.	148
Figura 21. Fotografías de muestras histológicas de tejido tímico de rata con tinción de H-E, donde se muestran las principales diferencias entre los animales control (A) y el grupo expuesto al SAR más elevado (12W) las fotos B, C y D. Foto B donde se refleja el aumento de vasos (V). Foto C la extravasación de glóbulos rojos (GR). Y en la foto D la presencia de células retículo-epiteliales de aspecto hemorrágico. Corteza (C), Médula (M), célula retículoepitelial (CRE), corpúsculos de Hasall (CH). Los * señalan CRE de aspecto hemorrágico. Aumento a 40X. Barra de calibración 50 μ m.	151
Figura 23. Fotografías de tejido tímico de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, que muestran las diferencias de inmunomarcaje en los subgrupos estudiados no expuestos a radiación (A) y (E) o expuestos a 1,5 (B y F), 3 (C y G) o 12 vatios (D y H). Las fotos A, B, C y D: animales sacrificados a los 90 min de la exposición, A a 0 W (control), B a 1,5 W, C a 3W y D a 12 W. Las fotos E, F, G y H: animales sacrificados a las 24 h de finalizada la exposición, E a 0W (control), Fa 1,5W, G a 3 W y H a 12 W. La expresión inmunohistoquímica de la proteína Hsp90 aparece con mayor inmunomarcaje a nivel de la corteza que en la médula .Corteza (C), Médula (M). Aumento a 20X, barra de calibración 75 μ m.	154

Esquemas:

Esquema 1. Representación esquemática de las propiedades físicas de las microondas: Reflexión, absorción y propagación en línea recta.	53
Esquema 2. Mecanismo de control de síntesis de hormonas tiroideas a través del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo mediante un sistema de retroalimentación negativo.	64
Esquema 3. Representación esquemática del proceso experimental 1 en los grupos 1 y 2 expuestos a radiación MO.	84
Esquema 4. Representación esquemática del proceso experimental 2, de la fase de exposición aguda (a) y de la fase de exposiciones repetidas (b).	86



The image features a large, light blue watermark of the USC logo, which is a diamond shape containing the letters 'U', 'S', and 'C' in a stylized font. Below the 'S' and 'C', the text 'UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' is written in a smaller, sans-serif font.

GLOSARIO DE
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

3D:	3 dimensiones
A:	amperio
AD:	acoplador direccional
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AE:	analizador de espectro
AM:	amplitud modulada
AMP:	amplificador
ANOVA:	análisis de la varianza
B:	Inducción magnética
BOE:	Boletín Oficial del Estado
BSA:	seroalbúmina bovina
c:	capacidad calorífica del tejido
CEM:	campos electromagnéticos
cm:	centímetro
CR:	cepo metacrilato
DAB:	3-3´diamino bencidina
DAPI:	4´, 6-diamidina-20-fenilindol dihidroclorato
DO:	densidad óptica
E:	intensidad del campo eléctrico
EEM:	espectro electromagnético
EHF:	Frecuencia extremadamente alta
ELF:	campos de frecuencia extraordinariamente baja
ELISA:	análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
EMF:	campos electromagnéticos , acrónimo inglés de electromagnetic field.
e ⁻ V:	electronvoltio
FDTD:	acrónimo inglés de Finite-Difference-Time-Domain
FM:	frecuencia modulada
GHz:	Gigahercio

ABREVIATURAS

gr:	gramo
GTEM:	Gigahertz Transverse Electromagnetic
GVS:	generador vectorial de señales
H:	intensidad del campo magnético
H-E:	hematoxilina-eosina
HHT:	hipotálamo-hipófisis-tiroides
HSF-1	Factor de estrés térmico 1
Hsp60:	Proteína de estrés térmico de 60 KDa
Hsp70:	Proteína de estrés térmico de 70 KDa
Hsp90:	Proteína de estrés térmico de 90 KDa
HSPs:	Proteínas de estrés térmico.
Hz:	Hercio
ICNIRP:	Comisión Internacional para la Protección de la Radiaciones No Ionizantes
IR:	radiación infrarroja
<i>J</i> :	corriente de conducción
KDa:	Kilodalton
Kg:	kilogramo
KHz:	Kilohercio
KPBS:	tampón fosfato potásico salino
$M \pm EEM$:	media y error estándar de la media.
m:	metro
M:	molar.
mg:	milígramo
MHz:	Megaherco
ml:	mililitro
MO:	microondas
MP:	medidor de potencia
° C:	grado centígrado
OMS:	Organización Mundial de la Salud
p:	probabilidad.
R:	rata

RF:	campos de radiofrecuencia
RI:	radiación ionizante
RNI:	radiación no ionizante
S:	siemens
SAR:	tasa de absorción específica, acrónimo inglés de Specific Absortion Rate.
SAR _e :	SAR específica
SHF:	Frecuencia super alta
T3:	triiodotironina
T4:	tetraiodotironina o tiroxina.
T ^a :	Temperatura
TRH:	hormona liberadora de tiotropina.
TSH:	tiotropina.
UHF:	Frecuencia ultra alta
UV:	ultravioleta
V:	voltio
VHF:	frecuencia muy alta
VLf:	muy baja frecuencia
W:	vatio
ϵ :	permitividad
λ :	longitud de onda
μ :	permeabilidad
μ T:	microtesla
v:	frecuencia
ρ :	resistividad
σ :	conductividad





RESUMEN



RESUMEN

Introducción: En el campo de la Medicina Física y Rehabilitación se utilizan las microondas por los efectos terapéuticos causados por el calentamiento en los tejidos. Se desconocen, sin embargo, cuales son los efectos subtérmicos tisulares de las microondas. Esta tesis es un estudio experimental de marcadores biológicos obtenidos en las glándulas tiroides y timos de las ratas después la exposición subtérmica a 2,45 GHz.

Objetivos: a) La obtención de un modelo experimental de radiación subtérmico en ratas Sprague-Dawley de exposición localizada con una sistema de radiación controlada a 2,45 GHz. b) Cálculo dosimétrico y estudio de marcadores biológicos tisulares y morfológicos en las glándula tiroides y timos de ratas que permitan determinar niveles de estrés celular después de la radiación de los animales.

Material y Métodos: Esta tesis se llevó a cabo mediante tres experimentos con un total de 246 ratas hembras sometidas a exposiciones, de radiación no ionizante durante 30 minutos, únicas y/o repetidas (durante 10 días) localizadas y máximas en la pata delantera izquierda. Se empleó para ello un sistema experimental de radiación controlada con una cavidad GTEM, aplicando una frecuencia de 2,45 GHz y potencias de 1,5, 3 o 12 W. Se estudió la tasa de absorción específica (SAR) después de radiación mediante el cálculo FDTD con el programa SEMCAD, así como la medición de los incrementos de temperatura de los animales mediante sondas rectales. Noventa minutos y veinticuatro horas postradiación se sacrificaron los animales y se hicieron estudios en las glándulas tiroides y en los timos de los niveles de proteínas de estrés celular Hsp90 y 70 mediante la técnica de ELISA. Además de los índices de lesión y/o apoptosis con tinciones con DAPI y/o Hematoxilina-Eosina y los cambios morfológicos de expresión inmunohistoquímica de Hsp90 en los tejidos del tiroides y timos de las ratas. La obtención de estos datos se realizó previa cuantificación y posterior análisis estadístico con el programa estadístico Sigma-Stat 3.1 mediante ANOVAS de una, dos o tres vías.

Resultados: Los valores estimados de SAR en tiroides o timos y en el cuerpo de los animales indicaron niveles subtérmicos e incrementos directamente proporcionales a la potencia recibida por cada subgrupo, así como diferencias significativas entre ellos. La Hsp90 sufrió un descenso significativo en las glándulas tiroides ($p < 0.01$) y en los timos para 12 W ($p < 0,035$) a los noventa minutos, y no aparecieron cambios significativos para Hsp70. Veinticuatro horas después de la radiación hay una recuperación parcial de la Hsp90 y total para la Hsp70 en tiroides y un descenso significativo de Hsp90 con 3 W ($p < 0.012$), sin cambios significativos para la Hsp70. La expresión inmunohistoquímica de la Hsp90 se modificó en las poblaciones celulares en las glándulas tiroides y los timos. No encontramos signos de apoptosis en las glándulas tiroides en ningún grupo experimental. Con exposiciones agudas se incrementaron inicialmente los diámetros de los folículos, para disminuir veinticuatro horas después. Con exposiciones repetidas tan solo los folículos periféricos mostraron un aumento en su tamaño ($p = 0,043$). A medida que se expusieron a mayores potencias, los timos de las ratas, se incrementó la distribución de los vasos ($p < 0,001$), de glóbulos rojos extravasados ($p < 0,005$, $p < 0,030$) y

células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico. El número de vasos aumentó en relación con la potencia aplicada veinticuatro horas postradiación.

Conclusiones: a) Las modificaciones tisulares y de estrés celular provocadas en las glándulas tiroides y timos de las ratas después de la exposición aguda y/o repetida indican que son sensibles a la radiación a 2,45 GHz por mecanismos subtérmicos. b) Los cambios en los niveles de proteína Hsp90 y en la morfología y en la vascularización de las glándulas tiroides y timos, constituyen marcadores biológicos fiables de los efectos de la radiación no ionizante.



1. INTRODUCCIÓN GENERAL





1.1. CONTAMINACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.

En los últimos años se ha establecido un duro debate acerca de los posibles efectos, sobre la salud, derivados de la exposición a campos electromagnéticos (CEM) no ionizantes.

Los seres vivos han estado expuestos a las radiaciones electromagnéticas desde sus orígenes, pero hoy en día la exposición a dosis cada vez mayores de radiación no ionizante, proveniente de multitud de electrodomésticos, redes eléctricas y el gran desarrollo tecnológico, sobre todo en el campo de las comunicaciones con la telefonía móvil, ha hecho que la exposición a campos electromagnéticos se haya incrementado de forma exponencial y con ello la preocupación por los posibles efectos derivados de la interacción con los seres vivos, sobre todo los posibles efectos en la salud humana. A pesar de los diferentes estudios realizados y muchos otros que se están llevando a cabo por diversos organismos, el conocimiento de los posibles efectos perjudiciales de la exposición a los campos electromagnéticos no se aclara, porque sus resultados en muchos casos son contradictorios.

En medicina también se ha incrementado progresivamente la utilización de aparatos emisores de campos electromagnéticos. En el campo terapéutico de la medicina física y rehabilitación se utiliza la radiación con microondas principalmente como termoterapia y por su efecto analgésico. Es entre los profesionales que aplican tratamiento mediante exposición con microondas donde se plantean los posibles efectos que éstas pueden causar sobre su salud, después de la exposición crónica o de exposiciones repetidas.

La aplicación de la radiación con microondas con fin terapéutico, en casos de dolor a nivel cervical o de hombro, hace que estructuras anatómicas sensibles a la radiación como la glándula tiroidea o el timo puedan tener alteraciones tanto a nivel morfológico como a nivel funcional.

1.2. ASPECTOS BÁSICOS DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA.

Los fenómenos electromagnéticos se deben a fuerzas originadas por cargas eléctricas en movimiento, por lo que toda carga además de crear un campo eléctrico, cuando se desplaza crea en el espacio que la rodea un campo magnético. Los campos electromagnéticos comprenden los campos estáticos, los campos de frecuencia extraordinariamente baja (ELF) y los campos de radiofrecuencia (RF), incluyendo las microondas, abarcando la gama de frecuencia de 0 Hz a 300 GHz.

James Clerk Maxwell fue quien sistematizó todos los hallazgos en el campo de la electricidad y el magnetismo. Años más tarde sería Heinrich Hertz quien produjo ondas electromagnéticas y Nicola Tesla y otros lograron concretar estudios para llegar a la invención de la radio o la telegrafía sin hilos, o sea, lo que es la televisión de hoy.

1.2.1. Características de los campos electromagnéticos.

En la naturaleza todos los seres vivos estamos expuestos a radiación electromagnética, ya que es un proceso que tiene lugar en todo el universo y nos llegan radiaciones que abarcan todas las regiones de espectro electromagnético.

Generalmente la radiación electromagnética se define como la propagación a través del espacio de energía procedente de la combinación de campos eléctricos y magnéticos oscilantes, perpendiculares entre sí y perpendiculares a la dirección de propagación de la onda.

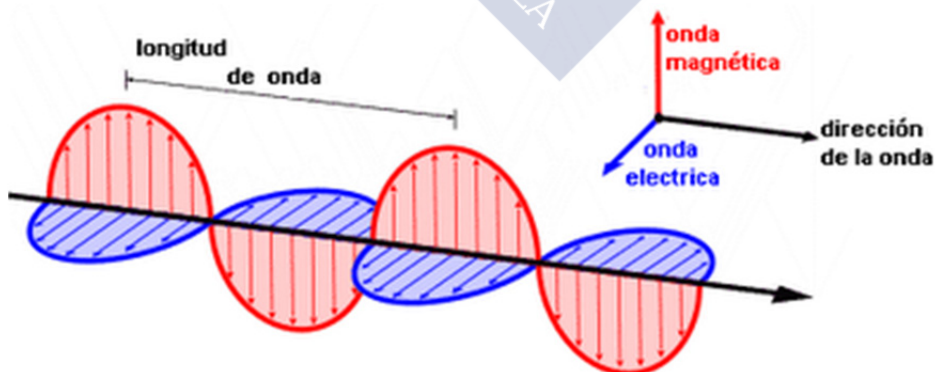


Figura 1. Representación esquemática de una onda electromagnética en forma de onda plana, polarizada en tres planos perpendiculares entre sí: onda magnética en rojo, onda eléctrica en azul y la punta de flecha indicando la dirección de propagación de la onda. Y representación de las referencias para medir la longitud de onda.

Los parámetros que definen a las ondas electromagnéticas son:

- La **frecuencia** (ν) de la radiación, que son el número de ciclos u oscilaciones por unidad de tiempo, su unidad de medida es el hercio (**Hz**) y un hercio equivale a un ciclo por segundo.
- La **longitud de onda** (λ) de la radiación, es la distancia recorrida por la onda en un ciclo u oscilación y su unidad de medida es el metro (**m**).
- La **energía de la radiación** que se mide en electronvoltio (**eV**) y corresponde con la energía cinética que adquiere un electrón al ser acelerado por una diferencia de potencial de un voltio.

Las radiaciones electromagnéticas se pueden clasificar en función de la energía de radiación en:

- a) **Radiaciones ionizantes**: son aquellas con la suficiente energía para arrancar un electrón de la capa más externa de átomos y por tanto capaz de provocar cambios o alteraciones en el ADN de las células.
- b) **Radiaciones no ionizantes**: son aquellas radiaciones sin suficiente energía para producir alteraciones moleculares. Dentro de éstas se incluye la radiación con microondas, que es el tipo de radiación que utilizaremos en el proceso experimental de esta tesis.

Los CEM se representan en el espacio a través de dos magnitudes vectoriales:

- a) La **intensidad del campo eléctrico** (**E**), que 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**).
- b) La **intensidad del campo magnético** (**H**), determina un campo magnético en cualquier punto del espacio. Se expresa en amperios por metro (**A/m**).

Estas magnitudes, que representan el CEM, cambian de valor en cada punto del espacio y en cada momento. Estas variaciones en las intensidades en el interior de un objeto van a depender de:

- Las fuentes de radiación.
- La forma y tamaño del objeto.
- Y de sus características electromagnéticas: permitividad (ϵ), conductividad (δ) y permeabilidad (μ).

1.2.2. Espectro de las ondas electromagnéticas.

El espectro electromagnético (EEM) es el conjunto de ondas electromagnéticas distribuidas siguiendo rangos de frecuencias y longitudes de ondas. Se pueden clasificar en función de su principal fuente de producción o en función de su capacidad de ionizar la materia: radiación no ionizante (RNI) o radiación ionizante (RI). Las RI comprenden aquellas radiaciones electromagnéticas con suficiente energía para arrancar electrones de las capas más externas de los átomos y por tanto con capacidad para alterar la estructura molecular; mientras que las RNI no poseen suficiente energía para producir alteraciones moleculares o romper enlaces intermoleculares.

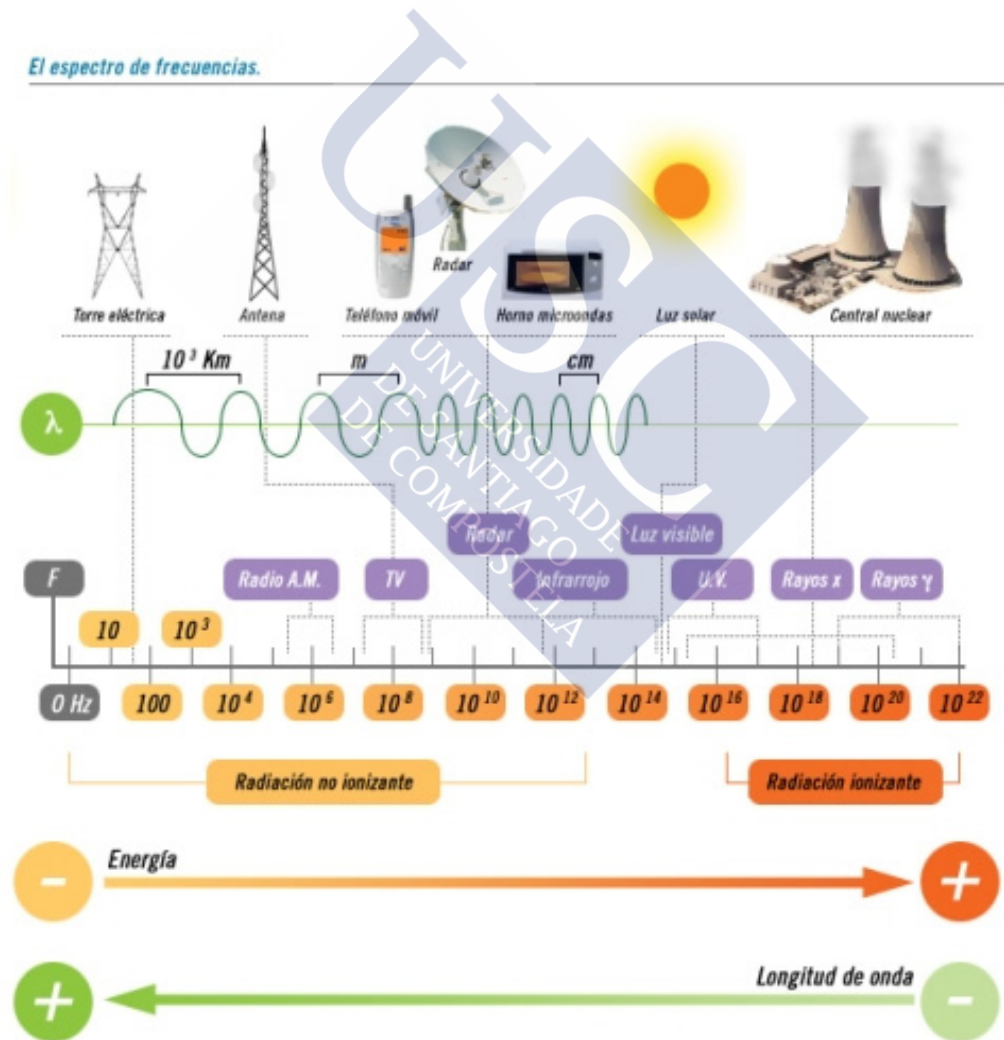


Figura 2. Esquema del espectro electromagnético con la distribución de las frecuencias y las longitudes de onda.

Región del espectro	Intervalo de frecuencias (Hz)
ELF- VLF	$0-10^5$
Radio-microondas	$10^5-3.0 \cdot 10^{12}$
Infrarrojo	$3.0 \cdot 10^{12}-4.6 \cdot 10^{14}$
Luz visible	$4.6 \cdot 10^{14}-7.5 \cdot 10^{14}$
Ultravioleta	$7.5 \cdot 10^{14}-6.0 \cdot 10^{16}$
Rayos X	$6.0 \cdot 10^{16}-1.0 \cdot 10^{20}$
Radiación gamma	$1.0 \cdot 10^{20}-\dots$

Tabla 1. Intervalo de frecuencias correspondiente a las diferentes regiones del espectro electromagnético.

Las distintas regiones del espectro electromagnético han sido distribuidas en función del rango de frecuencia, de menor a mayor frecuencia:

❖ Los **campos electromagnéticos de frecuencia inferior a la radiofrecuencia** (son las denominadas: Extremadamente baja frecuencia –ELF y muy baja frecuencia –VLF), abarcan la región del espectro electromagnético entre 0 y 100 KHz, en su mayor parte están originados por la generación, transporte y utilización de la energía eléctrica en las líneas de alta tensión.

❖ Las **ondas de radiofrecuencia**. Las ondas de radiofrecuencia (RF) 0 a 10^9 Hz se usan fundamentalmente para las comunicaciones vía satélite, radio (AM comprende el intervalo de 530 kHz a 1600 kHz y FM que comprende el intervalo de 88 MHz a 108 MHz), televisión (VHF) y telefonía móvil.

En el campo terapéutico se emplean en forma de corrientes alternas de frecuencia superior a 100 KHz. Y la onda corta con frecuencia entre 30-300 MHz.

❖ Las **microondas**: Las microondas (MO) se encuentran en el rango de frecuencias entre 1 GHz a 300 GHz. Se generan mediante dispositivos electrónicos. La mayoría de aplicaciones utilizan el rango de 1 a 40 GHz. Son utilizadas en multitud de sistemas de radar, radiodifusión, de telecomunicaciones como telefonía móvil y comunicación por satélite, en hornos microondas para calentamiento de alimentos y en terapéutica médica

conocida como diatermia (para calentamiento de tejidos profundos) y en el tratamiento de tejidos cancerosos sensibles a temperaturas entre 42° y 43° C.

Los rangos de MO utilizados se dividen en:

- Frecuencia ultra alta (UHF) entre 0.3 y 3 GHz
 - Frecuencia super alta (SHF) entre 3 y 30 GHz
 - Frecuencia extremadamente alta (EHF) entre 30 y 300 GHz.
- ❖ La **radiación infrarroja**: Los cuerpos calientes producen radiación infrarroja (IR), que no se puede ver pero sí se puede detectar por la sensación de calor que emite, excepto cuando alcanza la incandescencia que se hace visible. Su frecuencia se encuentra en la franja situada entre $3,0 \cdot 10^{12}$ y $4,6 \cdot 10^{14}$.
- La radiación de IR se utiliza en muchos campos como la industria, en astronomía, la construcción de visores especiales para visión nocturna y en medicina aplicándose en la termoterapia superficial y la termografía.
- ❖ La **luz visible**: Representa una región muy estrecha dentro del espectro electromagnético pero muy importante, ya que es la banda visible para el ojo humano. Se descompone en seis intervalos que definen los colores básicos (rojo, naranja, amarillo, verde, azul y violeta), las frecuencias más bajas se perciben como rojas ($3,8 \times 10^{14}$ Hz) y las más altas como color violeta ($7,5 \times 10^{14}$ Hz).
- ❖ Los **rayos ultravioleta**: Se encuentran situados en la franja comprendida aproximadamente entre los $7,5 \times 10^{14}$ Hz y los $3,0 \times 10^{16}$ Hz de frecuencia del espectro electromagnético. La radiación ultravioleta (UV) es el componente principal de la radiación solar y con un gran efecto fotoquímico. Son utilizados para la esterilización industrial de alimentos, para incrementar el brillo de los tejidos blancos, también se emplean en microscopía, permitiendo la obtención de imágenes con resolución mayor que con microscopios ópticos convencionales.
- ❖ Los **rayos X**: Se producen cuando se aceleran electrones que saltan de órbitas internas en átomos pesados. Sus frecuencias van de $1,1 \cdot 10^{17}$ Hz a $1,1 \cdot 10^{19}$ Hz. La gran

energía de los fotones de los rayos X los convierte en radiaciones ionizantes y por tanto muy peligrosas para los organismos vivos.

❖ Los **rayos gamma**: Son ondas electromagnéticas que se originan en los procesos nucleares. La enorme energía de los fotones gamma convierte a la radiación gamma en radiación ionizante, o sea, es capaz de interactuar con la materia orgánica y producir alteraciones celulares.

1.2.3. Interacción de los campos electromagnéticos con los tejidos biológicos: permitividad y conductividad.

La permitividad y conductividad son propiedades eléctricas de los tejidos biológicos que determinan como los campos eléctrico y magnético penetran y se propagan en el interior del cuerpo. La interacción de campos electromagnéticos con tejidos biológicos es muy compleja, existiendo discrepancias sobre los efectos biológicos de los campos electromagnéticos, porque aún no se han identificado los mecanismos por los cuales interactúan los campos con el cuerpo.

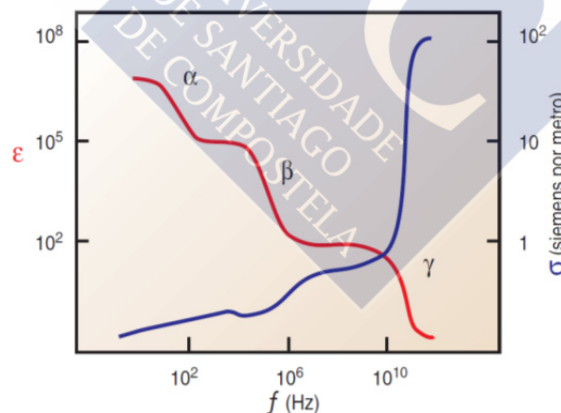


Figura 3. Relación entre permitividad y conductividad a nivel de tejidos biológicos: La permitividad (ϵ) y la conductividad (σ) eléctrica de un tejido disminuyen y aumentan respectivamente a medida que aumenta la frecuencia del campo eléctrico oscilante aplicado (Sebastián Franco J.L., 2006).

La **permitividad** se define como una constante física de proporcionalidad entre el campo externo aplicado y el campo en el interior de un material, por tanto describe cómo

un campo eléctrico afecta y es afectado por un medio. La tendencia general de la permitividad es a disminuir a medida que aumenta la frecuencia. También el contenido y estado del agua de un cuerpo juegan un papel importante en la determinación de la permitividad tisular y en la distribución del campo (Schroeder, M.J. et col., 2008). Típicamente la permitividad es entre un 10% o un 30% mayor en aquellos tejidos con un alto contenido de agua como la piel, músculo, el hígado y bazo (Foster K.R. y Schawn H.P., 1996).

Existe un amplio margen de valores de permitividad en los tejidos que se han medido a 30 GHz de frecuencia, los valores más altos corresponden a la sangre, hígado, músculo y cerebro, y los más bajos por orden decreciente corresponden al hueso, la piel y la grasa (Sebastián J.L. et col., 2006).

La **conductividad eléctrica** es la capacidad de un cuerpo de permitir el paso de la corriente eléctrica a través de él. Por tanto, la conductividad del tejido biológico, refleja la facilidad con la que los iones se desplazan por el medio impulsados por el campo eléctrico. De este modo cuanto mayor es la conductividad eléctrica del tejido mayor es la absorción, es decir, cuanto mayor es el contenido en agua de los tejidos mayor es la absorción de la radiación con microondas.

La conductividad es una de las características más importantes de los materiales y varía con la temperatura.

Representación matemática: Usualmente la magnitud de la conductividad (σ) es la proporcionalidad entre el campo eléctrico E y la densidad de corriente de conducción J :

$$J = \sigma E$$

y es la inversa de la resistividad, por tanto $\sigma = \frac{1}{\rho}$ y su unidad es el **S/m** (siemens por metro).

1.2.4. Unidades de medida de los campos electromagnéticos. Cuantificación del campo electromagnético en el tejido radiado. Cálculo de SAR.

Los estándares de seguridad para las exposiciones a campos electromagnéticos abarcan el intervalo de frecuencias entre 0 hercios (Hz) y 300 gigahercios (GHz), este intervalo se encuentra dentro del correspondiente a las radiaciones no ionizantes, aquel en el que la energía de un fotón es insuficiente para producir cambios en la estructura interna de una molécula o para romper enlaces intermoleculares. Por tanto, los efectos biológicos de la radiación no ionizante serán distintos, en diferentes organismos, en función de la frecuencia.

La determinación de la energía absorbida por un cuerpo ante la exposición a campos eléctricos y magnéticos de una señal de radiofrecuencia se denomina dosimetría. Los datos obtenidos con la dosimetría se representan en forma de Tasa de Absorción Específica (TAE o SAR acrónimo inglés de Specific Absorption Rate).

La energía electromagnética absorbida por un organismo depende principalmente de las siguientes variables:

- a) De los parámetros del campo incidente, o sea, de la frecuencia, polaridad y disposición del cuerpo ante el campo incidente.
- b) De las características del cuerpo expuesto, de su geometría tanto interna como externa o de sus propiedades dieléctricas (conductividad y permitividad).
- c) De los efectos de la tierra, reflexión/refracción y de otros objetos que puedan interferir entre el objeto y la fuente de radiación.

Para determinar la interacción entre radiofrecuencia y tejidos u organismos expuestos a la misma, son precisos los siguientes parámetros físicos:

1. La densidad de corriente inducida en los tejidos (J).
2. La intensidad del campo eléctrico interno (E).
3. La tasa de absorción específica o SAR.

La tasa de absorción específica, es la magnitud básica empleada en dosimetría de radiofrecuencia con microondas y definida como la cantidad de energía electromagnética absorbida por un tejido por unidad de masa.

La unidad de medida es el vatio por kilogramo (W/Kg).

La SAR es una medida del campo eléctrico en el punto de estudio y de la razón de calentamiento local (dT/dt), representado por:

$$dT/dt = SAR/c \text{ (}^\circ\text{C/sg)}$$

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

La fórmula matemática empleada para calcular la SAR es la siguiente:

$$SAR = \sigma \cdot E^2 t \cdot \rho^{-1} \text{ (W/Kg)}$$

representando σ la conductividad eléctrica del tejido (S/m), E el campo en el tejido (V/m) y ρ la densidad del tejido (Kg/m 3).

Según esta fórmula podemos observar que la SAR en los tejidos es proporcional al cuadrado de la intensidad del campo eléctrico generado en el interior del tejido, lo que convierte las determinaciones de SAR en un proceso muy complejo in vivo, para ello se han buscado alternativas para simular las determinaciones de SAR creando fantomas humanos en laboratorios, o bien a través de cálculos computacionales, utilizando software específicos para esta labor.

En estudios experimentales para determinación de SAR es preciso definir dos magnitudes que serán útiles:

- a) SAR promediado sobre el cuerpo completo, que representa la magnitud de SAR promediado sobre todo el cuerpo expuesto a la radiación.
- b) SAR local, que representa la magnitud de SAR en un punto o pequeña porción del cuerpo expuesto a la radiación.

Para la determinación experimental de la distribución de SAR específica (SARE) en un área plana en un volumen 3D se han desarrollado diferentes métodos, entre ellos:

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

1.2.5. Normativa relativa a los campos electromagnéticos.

La creciente exposición de la población a campos electromagnéticos (CEM) artificiales en el medio ambiente, ha hecho que se incremente la preocupación por sus posibles efectos perjudiciales en los organismos y haya sido necesario establecer unos límites de seguridad ante la exposición a radiaciones no ionizantes. Para ello, en el año 1992 la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con otros grupos de trabajo,

sobre protección de las radiaciones no ionizantes, crearon la Comisión Internacional para la Protección de las Radiaciones No Ionizantes (ICNIRP), basándose en la evidencia experimental disponible, que publicó en 1998 unas recomendaciones para limitar la exposición a campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos (ICNIRP, 1998). En estas recomendaciones se estableció el límite por debajo del cual se considera segura la exposición a CEM. Estos límites de exposición se establecieron basándose en exposición aguda y a corto plazo a CEM, puesto que la evidencia científica disponible sobre efectos a largo plazo se consideró insuficiente para poder marcar límites cuantitativos.

Aunque cada país ha establecido sus propias normativas relativas a CEM, la mayoría se han basado en las recomendaciones del ICNIRP. Así mismo, la Comisión Europea ha redactado una recomendación para la protección ante radiaciones no ionizantes (1999/519/CE) relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos (0 Hz a 300 GHz) de 12 de julio de 1999, que adopta los criterios y límites fijados por la ICNIRP. (RCMSUE-1999/519/CE de 12 de julio de 1999).

Estos límites de exposición han sido incorporados al ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto 1066/2001, de 28 de septiembre, (BOE núm. 234, 2001), por el que se aprueba el Reglamento que establece condiciones de protección del dominio público radioeléctrico, restricciones a las emisiones radioeléctricas y medidas de protección sanitaria frente a emisiones radioeléctricas. En España algunas comunidades han publicado sus propias legislaciones en cuanto a los límites de exposición a CEM, unas respetan los límites del Real Decreto (Baleares, Castilla-León, La Rioja y Madrid) y en otras los han reducido a la mitad (Castilla –La Mancha, Cataluña y Navarra). Estas normativas concluyen que no existe evidencia con los estudios disponibles de que las exposiciones a CEM dentro de los límites establecidos provoquen efectos perjudiciales para la salud.

En abril de 2004, a nivel europeo se estableció la Directiva 2004/40/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, sobre las disposiciones mínimas de seguridad y de salud relativas a la exposición de los trabajadores a los riesgos derivados de los agentes físicos (campos electromagnéticos) (decimoctava Directiva

específica con arreglo al apartado 1 del artículo 16 de la Directiva 89/391/CEE), entró en vigor el 30 de abril de 2004.

Los estudios epidemiológicos en los que se basan los distintos organismos para establecer los límites para la exposición a CEM en el público general pueden tener un periodo de latencia y/o periodo de exposición insuficiente para la obtención de conclusiones definitivas. Por ello, los continuos estudios sobre exposición a CEM hacen que estas recomendaciones de seguridad se revisen continuamente y estén abiertas a modificaciones en función de los nuevos hallazgos en relación a los efectos de los CEM sobre el ser humano.

1.2.6. Límites de la exposición a los campos electromagnéticos.

A nivel mundial las recomendaciones sobre límites de exposición a CEM establecidos por el ICNIRP en el 1998 son las más utilizadas, estableciendo restricciones básicas y niveles de referencia:

Restricciones básicas a la exposición de campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos, basadas en los efectos sobre la salud y en consideraciones biológicas (Tabla 2)

Niveles de referencia que determinan la posibilidad de que se sobrepasen las restricciones básicas, siendo su objetivo asegurar el cumplimiento de las mismas. (Tabla 3).

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

Tabla 2. Restricciones básicas para exposiciones a campos eléctricos y magnéticos para frecuencias entre 10 MHz y 10 GHz (ICNIRP, 1998).

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

Tabla 3. Niveles de referencia para exposiciones a campos eléctricos y magnéticos para exposiciones entre 2 y 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).

La guía de recomendación del ICNIRP establece unos límites de exposición más restrictivos para el público general que para las exposiciones ocupacionales, para ello se basa en que los profesionales incluyen población adulta y entrenada en la protección adecuada, mientras la población general incluye a personas de todas las edades y desconocedoras de los riesgos de la exposición y de las medidas de protección a tomar.

En los rangos de frecuencia comprendidos entre 100 KHz y 10 GHz las restricciones básicas son proporcionadas en términos de SAR para prevenir el estrés térmico en todo el cuerpo y el calentamiento localizado de tejidos.

Los valores de SAR deben ser promediados en periodos de 6 minutos y la masa para promediar el SAR localizado se considera cualquier tejido contiguo de 10 gr de masa.

1.3. APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LA RADIACIÓN CON MICROONDAS EN MEDICINA FÍSICA Y REHABILITACIÓN.

Las microondas son también conocidas como ondas radar u ondas centimétricas, se trata de corrientes electromagnéticas de alta frecuencia que se encuentran dentro del rango de espectro electromagnético situado entre las ondas VHF y el IR (300 MHz a 300 GHz).

Fue en el año 1948 en el Congreso Americano de Medicina Física celebrado en Atlantic City cuando se estableció el nivel de emisión de generadores microondas para

uso médico con longitudes de onda y frecuencias de 32,7 cm /915 MHz, 69 cm /433.92 MHz y de 12,25 cm/ 2.450 MHz respectivamente (Robertson, V.J. et col., 2006), siendo la mayoría de aparatos de uso médico en España de longitud de onda de 12,25 cm y frecuencias de 2.450 MHz (Guy, A.W. et col., 1974). Los aparatos de microondas que funcionan a frecuencias de 433.92 MHz, son los llamados UHF u ondas decimétricas.

1.3.1. Diatermia electromagnética.

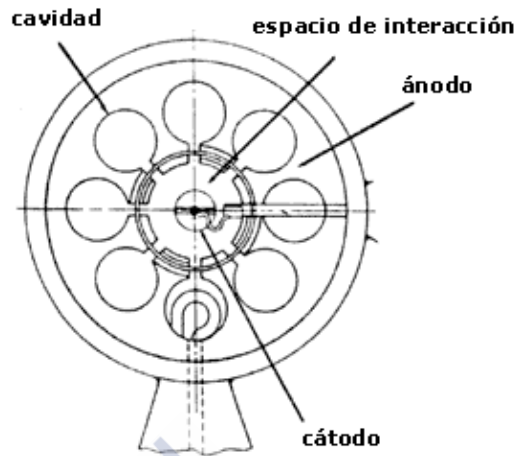
La aplicación terapéutica de diatermia electromagnética es principalmente en el calentamiento de tejidos profundos, por el efecto terapéutico atribuido al calor. La energía electromagnética es transformada en energía calorífica por la resistencia que los tejidos ofrecen al paso de la corriente de alta frecuencia por los distintos tejidos, por el efecto Joule. Así, en función de las características de los tejidos respecto a la resistencia eléctrica, estos se calentarán más o menos. Se ha comprobado que la piel y el tejido subcutáneo son los que más se calientan y el tejido muscular en menor grado, debido a que el mayor contenido electrolítico le confiere mejor conductibilidad. Las modalidades de termoterapia profunda utilizadas para tratamientos de rehabilitación son la onda corta y las microondas. La diferencia entre ambas viene determinada por las longitudes de onda y las frecuencias en que operan los aparatos generadores, así la onda corta tiene una longitud de onda de 11,6 m y una frecuencia de 27,12 MHz y las microondas tiene una longitud de onda de 12,25 cm y frecuencia de 2.450 MHz.

1.3.2. Mecanismo de producción. Aparatos de microondas terapéuticas.

La radiación con microondas se produce por un dispositivo o aparato que se conoce como magnetrón. Este aparato está formado por un cilindro metálico aniónico con una serie de cavidades (ánodo) en toda la circunferencia que se comunican con otra central de mayor tamaño, en cuyo centro hay un filamento metálico (cátodo) conectado a una corriente continua y sometido a un campo magnético (Figura 4). Cuando se activa la corriente eléctrica el filamento central emite electrones que se recogen a través de un cable coaxial hasta un director o radiador por el que se realiza la aplicación terapéutica.

Para verificar la presencia de la radiación se utilizan detectores o tubos fluorescentes.

(A)



(B)

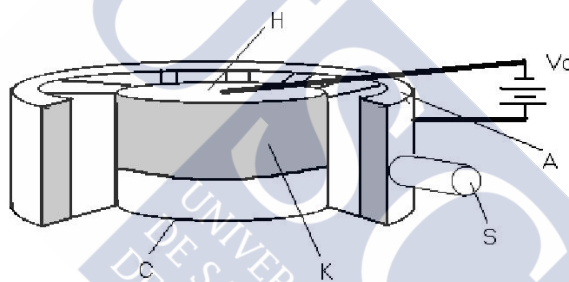


Figura 4. (A) y (B) Magnetron de un aparato de microondas. Ánodo (A), Capa del cátodo (C) Campo magnético (H), Cátodo (K), Salida de frecuencias (S), Voltaje (V_0).

Los aparatos de microonda utilizados para diatermia terapéutica están formados básicamente de:

- Cuerpo central, donde se localiza el magnetron
- Cable coaxial, conduce la radiación desde el magnetron al aplicador
- Directores o aplicadores, situados sobre un brazo articulado, en ellos se localiza la antena. Hay diferentes tipos de aplicadores, según su forma y según contacte o no con la superficie a tratar.



Figura 5. Aparato de microondas terapéutica.

Los aparatos de diatermia por microondas pueden emitir radiación de forma continua o pulsada. La ventaja de la forma pulsada es que tiene un efecto diatérmico menor, ya que durante las pausas se permite una mayor disipación de calor y por tanto la aplicación es más amplia que en el modo continuo.

1.3.3. Bases físicas de la terapia con microondas.

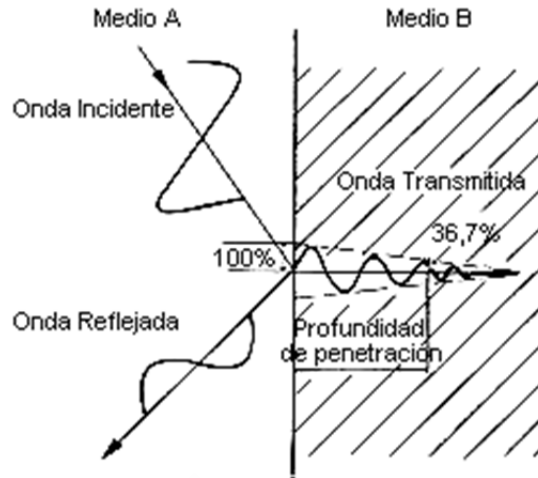
Las microondas presentan las siguientes propiedades físicas:

1) Propiedades ópticas: las ondas centimétricas siguen las leyes de la óptica y por tanto pueden:

- **reflejarse**
- **refractarse**
- **difractarse**
- **focalizarse.**

2) Absorción del haz de ondas.

3) Propagación del haz de ondas en línea recta (Zaragoza J.R., 1992).



Esquema 1. Representación esquemática de las propiedades físicas de las microondas: Reflexión, absorción y propagación en línea recta.

El haz de microondas se propaga en línea recta y su intensidad disminuye a medida que se aleja del foco emisor, fundamentalmente por:

- La **divergencia** del haz, que sale del aplicador en forma de haz cónico y se va agrandando a medida que se aleja, esta dispersión del haz está en relación directa a la longitud de onda e inversamente al radio del reflector.
- La **absorción** de la energía, que va disminuyendo a medida que atraviesa los tejidos o materiales. La absorción en el tejido biológico va a depender fundamentalmente de:

La longitud de onda, a menor longitud de onda mayor absorción y menor penetración.

Las propiedades electromagnéticas de los tejidos: *permitividad* y *conductividad*:

El espesor de la grasa subcutánea, cuanto mayor es el espesor del tejido graso mayor es la penetración. Esto permitirá que la radiación penetre a través de la piel y tejido graso subcutáneo con escasa absorción y produzca calentamiento de tejidos más profundos como el muscular.

- La **reflexión** del rayo, al paso por los distintos medios e interfases, produce pérdida de energía. El coeficiente de reflexión muestra la relación entre la intensidad incidente y la reflejada para cada tejido, así Boin y Lotman determinaron el coeficiente de reflexión de microondas de 2.450 MHz para

distintos tejidos (Tabla 4). Observamos que la energía reflejada llega a ser considerable y su riesgo es el calentamiento excesivo de tejidos adyacentes con riesgo de quemaduras.

	AIRE	PIEL	MUSCULO	GRASA
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 4. Coeficiente de reflexión para microondas de 2.450 MHz para diferentes tejidos determinados por Boin y Lotman.

La profundidad de penetración de la microonda varía en función de la frecuencia y de las características del tejido, así para frecuencias de 2.450 MHz penetran hasta 1,7 cm en músculo y piel y 11,2 cm en hueso y grasa; mientras que para frecuencias de 915 MHz el coeficiente de reflexión se reduce aumentando la energía que llega al tejido y la profundidad de penetración (Lehmann J.F. y de Lauter B.J., 1993).

1.3.4. Dosificación de las microondas.

Para estudiar los efectos biológicos de la radiación con microondas se considera muy importante la determinación de **SAR**, pero en el empleo de la radiación con microondas terapéutica esta determinación se considera menos importante debido a la gran dificultad para su cálculo, por esto la dosificación terapéutica en la práctica médica va a depender de los siguientes factores:

- La potencia del aparato de microondas, que indica la cantidad de energía radiada, varía entre 25 y 200 vatios.
- El tiempo de aplicación, en un estudio realizado en 1953 calcularon que la exposición efectiva mínima es de 5 minutos, alcanzando los máximos efectos a los 30 minutos (Lehmann J.F., 1953). En la práctica el tiempo de aplicación varía entre 5 y 20 minutos.

- La distancia a la que se sitúa el paciente.
- La superficie cutánea radiada.
- La sensación térmica del paciente.

Habitualmente, en la práctica clínica lo que se utiliza es la dosificación subjetiva, se tiene en cuenta la sensación térmica del paciente, para evitar quemaduras, ya que los aparatos de diatermia no disponen de indicadores de temperatura real del tejido radiado.

GRADO	SENSACIÓN TÉRMICA
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 tolerancia

Tabla 5. Clasificación de dosificación clínica de Schliephake.

En la práctica clínica, teniendo en cuenta la sensación térmica, se utilizan dosis bajas (grado I o II) de corta duración en procesos agudos y dosis mayores (grado III o IV) en procesos crónicos.

La intensidad de los efectos fisiológicos, debidos al aumento de temperatura por exposición a radiación con microondas dependen de:

- El nivel de temperatura alcanzado en los tejidos.
- La duración de la elevación de la temperatura.
- La velocidad del aumento de la temperatura.
- Y de la extensión del área tratada.

El espectro terapéutico se encuentra aproximadamente entre 40° y 45,5° C, temperaturas superiores suponen un riesgo de necrosis en los tejidos, por ello se considera segura la terapia con hipertermia si se mantiene la temperatura por debajo de 45°C (Dewhirst M.W. et col., 2003).

1.3.5. Efectos fisiológicos conocidos de la aplicación de diatermia por microondas.

Los efectos fisiológicos derivados de la aplicación de calor con microondas, que determinan sus aplicaciones terapéuticas, se producen por el incremento de la temperatura en los tejidos expuestos, siendo el aumento del flujo sanguíneo el principal efecto del que derivan los beneficios de la hipertermia (Wyper D.J. y McNiven D.R, 1976). El calor produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular que provocan una serie de efectos fisiológicos locales (Tabla 6).

Incrementa la llegada de nutrientes y oxígeno en los tejidos expuestos, ayudando a la reparación tisular.
Aumenta la extravasación celular en el área expuesta
Mejora el drenaje de sustancias residuales y del exceso de fluidos, facilitando la reabsorción de edemas o hematomas (Lehmann J. F. et col., 1993).
Favorece la producción y secreción de citoquinas inductoras de la reparación tisular.
Mejora la contractilidad muscular mediante el aumento de la actividad ATPasa y cambios en las propiedades viscoelásticas del tejido conjuntivo.
Modifica la respuesta nerviosa sensitiva, disminuyendo la sensación de dolor.

Tabla 6. Efectos fisiológicos conocidos provocados localmente sobre tejidos con la aplicación de microondas.

Además de que la hipertermia produce aumento de la permeabilidad de la membrana celular, también se ha demostrado que incrementa la síntesis de proteínas de estrés térmico (HSPs). Así, se está estudiando la utilización de fármacos que actúan de forma específica a través de la membrana celular de forma sinérgica con la aplicación de calor, con el fin de ayudar a potenciar su acción. Del mismo modo se está investigando la posibilidad de mejorar efectos terapéuticos beneficiosos con la inducción de HSPs para favorecer la protección frente a enfermedades musculoesqueléticas (Ogura Y. et col., 2007; Xiao J. et col., 2007; Millar N.I. et col., 2008).

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

Las indicaciones de la aplicación terapéutica con microondas son fundamentalmente en aquellos procesos que se benefician de los efectos proporcionados por el calor profundo, sobre todo en tejido muscular y en todos aquellos con alta concentración de agua e iones (Robertson, V.J. et col., 2006). Algunos procesos localizados en articulaciones superficiales, también se pueden beneficiar del tratamiento con microondas ya que pueden ser susceptibles de un calentamiento eficaz.

La zona óptima de tratamiento con microondas se localiza en una profundidad de 3-4 centímetros de la piel (Rioja Toro J., 1996).

Las principales indicaciones del tratamiento con microonda en Medicina Física y Rehabilitación se indican en la tabla 7.

Rigideces articulares por retracción del tejido conectivo, gracias al aumento de las propiedades viscoelásticas del tejido conectivo.
Tendinopatías
Contracturas musculares , por su acción antiespástica
Reabsorción de hematomas musculares
Procesos artríticos en que afectan a articulaciones superficiales
Procesos dolorosos fundamentalmente de origen muscular

Tabla 7. Principales indicaciones para la aplicación terapéutica de las microondas.

Aunque los estudios científicos sobre la efectividad de la aplicación terapéutica con microondas son escasos y poco rigurosos, esto hace que sea difícil establecer unas indicaciones específicas. La mayoría de estudios comparan el tratamiento con la aplicación con microondas y otros tratamientos de terapia física. Y en ocasiones se utilizan varias modalidades terapéuticas, que hacen imposible conocer el efecto derivado exclusivamente de la aplicación con microondas.

1.3.7. Otras aplicaciones terapéuticas con microondas en medicina.

En los últimos 15 años la utilización de microondas en medicina se ha incrementado de forma importante, entre estas terapias se encuentran las incluidas en la tabla 8 (Vera A. et col., 2001; Rosen A. et col. 2002).

Tratamiento del cáncer, en tumores sólidos con gran vascularización, mínimamente invasivo
La ablación de hiperplasia benigna de próstata y endometrio
Liposucción
Obstrucción de la vía aérea superior y apnea del sueño
Ablación como tratamiento de arritmias cardíaca: taquicardia supraventricular y taquicardia ventricular
En cirugía artroscópica de hombro, rodilla y patología de disco intervertebral

Tabla 8. Aplicaciones de microondas más recientes en medicina.

1.3.8. Contraindicaciones de la aplicación terapéutica con microondas en Medicina Física y Rehabilitación.

Las contraindicaciones para la aplicación terapéutica con microondas aparecen reflejadas en la tabla 9 (Rioja Toro J., 1996).

Material metálico en el campo de aplicación , provocando calentamiento excesivo de tejidos adyacentes, incluso quemaduras
Portador de dispositivos implantables como marcapasos o desfibriladores y audífonos
Trastornos de coagulación , la vasodilatación intensa puede provocar hemorragia local
Arteriopatía obstructiva , puede favorecer la aparición de gangrena
Traumatismos recientes en los primeros 2-3 días por riesgo de favorecer la evolución a una miositis osificante
Aplicación sobre el ojo , por riesgo de dañar el cristalino y provocar cataratas.
Aplicación sobre placa fisaria por la posibilidad de alteraciones en el crecimiento óseo.
Neoplasia , por la posibilidad de favorecer la diseminación a distancia.
Infección aguda , por el riesgo de diseminación del foco infeccioso.
Embarazo

Tabla 9. Contraindicaciones para la aplicación de microondas.

1.4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN NO IONIZANTE.

1.4.1 Efectos de la radiación electromagnética de radiofrecuencia sobre los tejidos: Efectos térmicos, atérmicos y no térmicos.

Los posibles efectos biológicos resultantes de la exposición a radiaciones electromagnéticas se han clasificado en: efectos térmicos, no térmicos y atérmicos (Laurence J.A. et col., 2000; Sebastián Franco, JL et col., 2006):

- a) Los **efectos térmicos** ocurren cuando en un organismo expuesto se deposita la suficiente energía de RF capaz de producir un aumento de temperatura (T^a) medible, superior a $0,1^{\circ}\text{C}$.
- b) Los **efectos no térmicos** ocurren cuando la energía depositada en el organismo no es suficiente para producir un incremento de T^a , incluso sin que intervengan los mecanismos termorreguladores.
- c) Los **efectos atérmicos** ocurren cuando en el organismo se deposita suficiente energía para producir incremento de T^a , pero con la ayuda de los mecanismos termorreguladores no llega a ser considerable.

La radiación emitida por radiofrecuencia (RF) penetra en los tejidos expuestos hasta profundidades de un centímetro, como en el caso de las utilizadas por telefonía móvil, dependiendo de la frecuencia. La energía de RF es absorbida en el tejido produciendo calentamiento del mismo, y el mecanismo molecular básico por el que se produce el calor es porque, al interaccionar la radiofrecuencia con el tejido, genera vibraciones y oscilaciones de moléculas polares como el agua y esta energía rotacional genera calor (Challis L.J., 2005) pero el mecanismo termorregulador ayuda a su disipación.

En Europa y Estados Unidos se han basado casi exclusivamente en los efectos térmicos a la hora de establecer los límites de seguridad en las exposiciones a radiaciones no ionizantes, ya que hay suficiente evidencia científica de la implicación de los efectos térmicos sobre los mecanismos biológicos. Pero la energía de RF puede interactuar con los tejidos sin llegar a producir un calentamiento significativo, lo que ha provocado que en las últimas décadas se haya abierto un debate sobre la posibilidad de la implicación de

efectos no térmicos sobre el organismo, o sea, que no se pueden explicar por el incremento de temperatura (Banik S. et col., 2003; Dawe A.S. et col., 2006).

Hasta hace poco tiempo, los efectos establecidos debido a la exposición a RF se suponían que eran debidos sólo al calentamiento. Sin embargo múltiples estudios han demostrado la existencia de efectos biológicos en la exposición a campos electromagnéticos de baja intensidad, los cuales no pueden ser atribuidos al calentamiento. Así diversos estudios demuestran alteraciones fisiológicas de naturaleza atérmica en la exposición a microonda, entre ellos: alteración de la estructura y función de la membrana celular (Phelan A.M. et col., 1994); alteración de procesos metabólicos celulares (Samarketu S.P. et col., 1996); en cultivos celulares se ha observado inducción de cambios en la expresión genética (Lee, S. et col., 2005); estimulación en la producción de proteínas del estrés térmico (French P.W. et col., 2000). Aunque estos resultados no han podido ser corroborados por otros autores (Adair R.K., 2003; Chauhan V. et col., 2006), que explican estos efectos por posibles errores en los sistemas de medición, o por la presencia de puntos calientes no detectados (Antonio C. y Deam R.T. 2007). Por lo que es necesario seguir investigando para poder llegar a conclusiones definitivas.

1.4.2. Empleo de sistemas experimentales de radiación.

Para el estudio experimental de los efectos de la radiofrecuencia en animales se han diseñado sistemas de radiación para controlar múltiples parámetros (Swicord M. et col., 1999), y dentro de nuestro grupo de investigación se ha diseñado un sistema experimental de exposición a radiofrecuencia con una cavidad de onda estacionaria que permite realizar medidas de la potencia absorbida en regiones de interés, en animales expuestos de forma controlada en un modelo experimental neurológico subconvulsivo con picrotoxina (López-Martín E. et col., 2006, 2008, 2009). Para esta tesis, se ha diseñado un sistema experimental de radiación, para la exposición de animales pequeños, con una cavidad comercial (GTEM) de onda viajera. Aparece descrito en el apartado de material y método de esta tesis.

1.4.3. Investigación de los efectos de los campos electromagnéticos en los seres vivos. Efectos sobre la glándula tiroides y el timo.

La localización de la glándula la tiroides y el timo los hace muy propensos a estar sometidos a altas tasas de absorción específica, tanto de microondas como de otras ondas de radiofrecuencia, pudiendo ser la causa de alteraciones tanto estructurales como funcionales en la glándula tiroides y en el timo.

1.4.3.1. Morfología y función de la glándula tiroides.

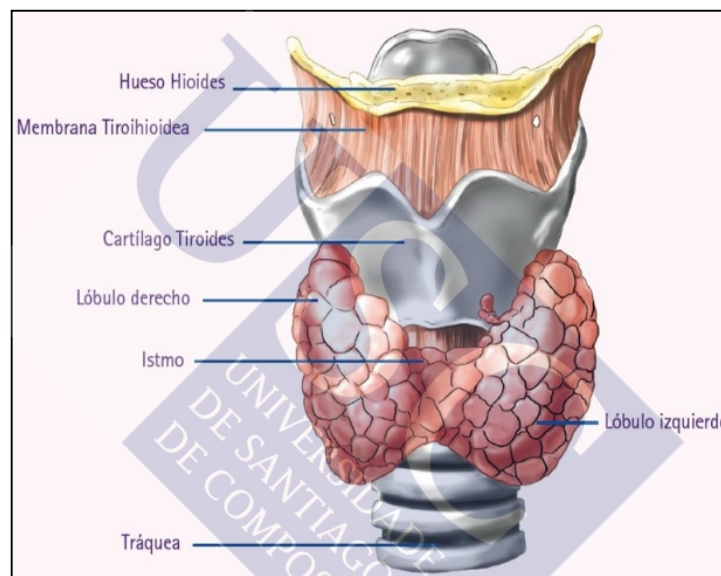


Figura 6. Vista frontal de glándula tiroides con forma de mariposa, localizada rodeando la cara anterior y lateral de la tráquea, por debajo del cartílago tiroides.

La glándula tiroides se encuentra localizada en la cara ventral del cuello, por delante de la tráquea, debajo del cartílago tiroides y aproximadamente a un centímetro de la piel. Está compuesta por dos lóbulos unidos por un istmo, con forma de mariposa. Está rodeada por una fina cápsula de tejido conjuntivo de la que surgen tabiques que penetran hacia el interior de la glándula formando lóbulos y lobulillos.

Las células que constituyen la glándula son: las *células epiteliales o foliculares* que se sitúan formando estructuras esféricas llamadas *foliculos tiroideos* y cada foliculo está rodeado de una membrana basal. Los foliculos contienen en su interior el

coloide que sirve como almacén temporal de las hormonas tiroideas, en forma de tiroglobulina. Entre los folículos hay tejido conjuntivo con gran abundancia de capilares sanguíneos y linfáticos, así como fibras nerviosas, que en su mayor parte conectan con los vasos sanguíneos, mientras que otras conectan con las células epiteliales.

En el tiroides también hay unas células de mayor tamaño que las foliculares llamadas *células parafoliculares, claras o C* que sintetizan la hormona llamada *calcitonina*, que juega un papel importante en la homeostasis del calcio y fósforo, disminuyendo los niveles de calcio y fósforo en la sangre, para ello inhibe la absorción intestinal de calcio, la resorción ósea, la reabsorción de fosfato a nivel de los túbulos renales y aumenta la reabsorción absoluta de calcio a nivel renal. Estas células se localizan entre las células epiteliales del folículo, sin contactar con el coloide y aisladas en el tejido conjuntivo.

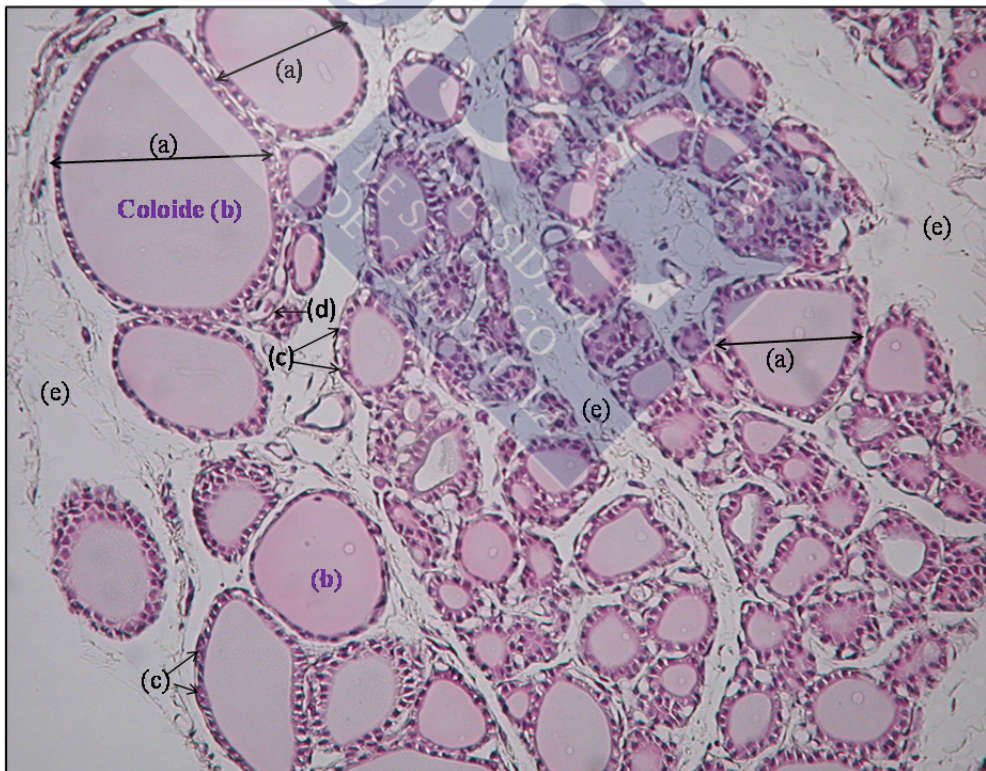


Figura 7. Tinción con Hematoxilina -Eosina en una muestra histológica de glándula tiroidea de rata, donde se indican los componentes principales del tejido tiroideo: (a) folículo, (b) coloide, (c) células foliculares, (d) células parafoliculares, (e) tejido conectivo. 20X.

El folículo tiroideo constituye la unidad funcional del tiroides, es el lugar en el que se produce la biosíntesis y almacenamiento de las hormonas tiroideas, triiodotironina (T3) y la tetraiodotironina o tiroxina (T4).

La pared del folículo está constituida por una sola capa continua de *células epiteliales o foliculares*, que tienen una morfología variable en cuanto a su altura, según su estado funcional, así pueden ser aplanadas o cúbicas bajas cuando se encuentran en reposo, pero cuando desarrollan su función de secreción hormonal, pasan a ser cilíndricas. El borde celular que mira hacia el interior del folículo se denomina *polo apical* con aspecto de cepillo, en el lado opuesto está el *polo basal*, en contacto con la membrana basal y por fuera de ella abundantes capilares. Estas células epiteliales observadas con el microscopio óptico, tienen un núcleo grande, central y citoplasma basófilo. Y con microscopio electrónico, poseen microvellosidades en el polo apical, con escasas mitocondrias en el citoplasma.

Las células epiteliales presentan un alto grado de diferenciación celular, ya que son capaces de concentrar yodo, organificarlo e incorporarlo a una proteína específica llamada *tiroglobulina*, también son capaces de hidrolizar esta proteína y liberar fuera de la célula las hormonas tiroideas T4 y en menos cantidad T3 que actuará en tejidos periféricos.

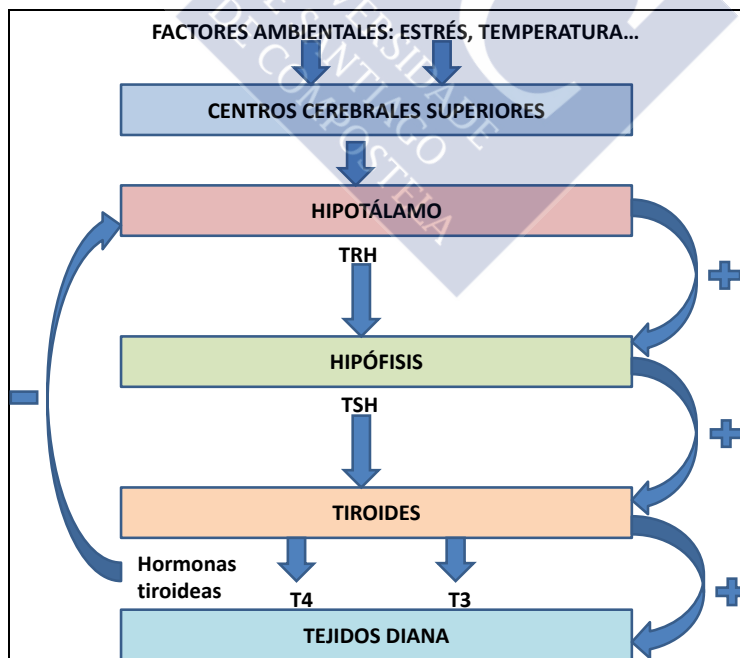
En el interior del folículo se encuentra el coloide que contiene las moléculas de tiroglobulina, cuando es necesario la liberación de hormonas tiroideas, el coloide es incorporado al interior de la célula a través del borde apical por mecanismo de endocitosis. Es transportado por el interior de la célula durante el cual se produce la hidrólisis y formación de las hormonas tiroideas, siendo liberadas a través del polo basal. Por tanto, la función de la glándula tiroides es la producción de hormonas tiroideas, que regulan un gran número de procesos metabólicos, por tanto, de su correcto funcionamiento depende el desarrollo y crecimiento apropiados, así como otras funciones básicas como la reproducción y adaptación al medio. Todas estas acciones las realizan regulando la producción y actividad de otras enzimas (Casanueva F. et col., 1995)

Aumentan la producción de energía y consumo de oxígeno en los tejidos del cuerpo
Aumentan la producción de calor.
Favorecen el crecimiento, estimulando la secreción de la hormona de crecimiento y actuando sobre los condrocitos de la lámina epifisaria del hueso.
Participan en el desarrollo del sistema nervioso en el feto
Tienen un importante papel en el desarrollo y funcionamiento del aparato reproductor.

Tabla 10. Principales funciones de las hormonas tiroideas.

1.4.3.2. Mecanismo de control de la secreción de hormonas tiroideas: Eje Hipotálamo-Hipófisis- Tiroides (H-H-T).

El control de la secreción de las hormonas tiroideas está regulado por el hipotálamo a través de la *hormona liberadora de tirotropina* (TRH) que estimula la glándula hipófisis para liberar la *tirotropina* (TSH), ésta estimula a la glándula tiroides para la producción y liberación de las hormonas tiroideas. Los niveles de hormona tiroidea en sangre son los que regulan la secreción de TSH a través de un mecanismo de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo (Casanueva F. et col., 1995).



Esquema 2. Mecanismo de control de síntesis de hormonas tiroideas a través del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides mediante un sistema de retroalimentación negativa.

1.4.3.3. Cambios en la glándula tiroides tras exposición a campos electromagnéticos.

1.4.3.3.1. Cambios en la morfología a nivel de la glándula tiroides.

En los estudios de la morfología de la glándula tiroides de animales expuestos a campos electromagnéticos hay controversia acerca de la existencia de cambios morfológicos (Rajkovic V. et col., 2003; Rajkovic V. et col., 2005). Hay estudios morfológicos de glándulas expuestas a radiación con microondas donde se observaron cambios estructurales, indicativos de estimulación de la glándula, demostrados por un incremento en la concentración de yodo radiactivo. Sin embargo, R.L Magin, no observó cambios estructurales en glándulas tiroides expuestas a radiación con microondas (Magin R.L., 1977). Al igual que Wright, donde no obtuvo cambios histopatológicos que pudieran ser atribuidos a efectos no térmicos en animales expuestos a RF (28 MHz) (Wright N.A. et col., 1984).

En otro estudio más reciente se ha demostrado la existencia de cambios estructurales en ratas expuestas a CEM de 50 Hz, observando una predominancia de microfolículos con menor contenido en coloide y dilatación de los capilares, con un incremento estadísticamente significativo de la densidad de volumen del epitelio folicular, del tejido folicular y de los capilares sanguíneos, así como del índice de actividad del tiroides (Rajkovic V. et col, 2006).

1.4.3.3.2. Cambios en la secreción hormonal de la glándula tiroides.

Al igual que en la existencia o no de cambios morfológicos, aquí también hay controversia sobre los cambios en la secreción hormonal por exposición a CEM. A finales de la década de los 60 del siglo pasado, ya se inició la investigación sobre el efecto de la exposición a microondas sobre el sistema hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) en exposición laboral y en animales experimentales. Aunque se observó aumento en la actividad del tiroides, no se pudo establecer una correlación entre la actividad del tiroides y la exposición individual a microondas. Ya en la década de los 70, investigadores americanos estudiaron el efecto de la exposición con microondas a frecuencia de 2.450 MHz de forma crónica y no encontraron cambios o sólo leves reducciones en la actividad de la glándula tiroides (Magin R.L et col., 1977).

En la literatura podemos encontrar descritos cambios en la secreción hormonal de tiroides, tanto incremento como descenso, en animales expuestos experimentalmente a radiación con microondas (Lu S-T et col., 1985; Rajkovic V. et col., 2003; Koyu et col., 2005). Muchos autores han demostrado que el efecto de la exposición con microondas de forma aguda, produce inhibición de la actividad tiroidea (Wright et col., 1984; Kozhevnikova et col., 1989; Eşmekaya M.A., 2010) o aumento de la actividad tiroidea (Saddiki Traki et col., 1986; Lu et col., 1985). En caso de exposiciones repetidas observaron descensos en la actividad del tiroides (Lu et col., 1985; Navakatikian et col., 1990). Así, en animales pequeños como ratas, ratones y conejos se observó disminución de la actividad de la glándula tiroides y en animales grandes como primates o cerdos de guinea incremento de la actividad (Mason, J.W. 1968). Sin embargo, también se ha descrito ausencia de alteraciones hormonales del tiroides, en poblaciones expuestas a dicha radiación (Inaba, R., 1991).

En estudios en los que realizaron exposiciones selectivas de la glándula tiroides a radiación con microondas, se observó que el calentamiento local de la glándula incrementaba la tasa de liberación de hormonas tiroideas, independientemente del efecto del calentamiento sobre hipotálamo y sobre la glándula hipófisis (Magin R.L. et col., 1977). Sin embargo, no hay estudios que describan el efecto en la glándula tiroides con niveles de radiación subtérmicos.

Esta diferencia, en los resultados de los estudios, podría ser debida a la variación de las condiciones de exposición utilizada, ya que la absorción de energía en los tejidos varía según la frecuencia, polarización y la densidad de corriente del campo electromagnético incidente, así como de la orientación y el tamaño del animal. Para evitar estas diferencias, es necesario medir la tasa de absorción específica (SAR) en los tejidos y poder determinar la relación dosis-respuesta de los posibles efectos biológicos, debidos a la exposición a microondas. Según Lai y colaboradores (1985), la determinación de SAR de cuerpo entero no es suficiente como predictor de los efectos de exposición a microondas, pudiendo ser la distribución de energía local y la respuesta observada tomada en consideración para el conocimiento de los efectos biológicos de la exposición a microondas.

1.4.3.4. Morfología y función del timo.

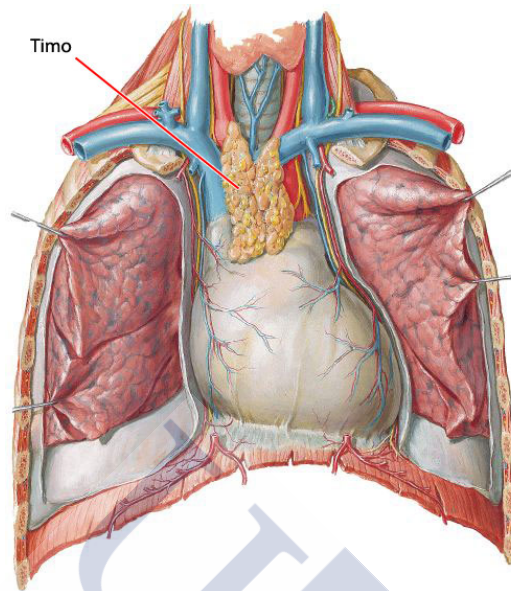


Figura 8. El timo localizado en el mediastino anterior. En el cuerpo humano se sitúa por delante de la tráquea, con morfología bilobulada.

El timo es un órgano linfoide primario, en el que se produce la maduración de los linfocitos T, y también la secreción de algunas hormonas (timulina, timopoyetina y timosina) y factores solubles, que van a controlar la producción y maduración de los linfocitos T en el timo y además regular la actividad y las interacciones de las células T en los tejidos periféricos. Su máxima actividad se produce durante los primeros años de vida, sufriendo posteriormente una atrofia en la que es sustituido por tejido adiposo en su mayoría.

El timo se localiza en el mediastino anterosuperior por delante de la tráquea. Está formado por dos lóbulos rodeados por una cápsula de tejido conectivo que los mantiene unidos, de esta cápsula parten tabiques de tejido conectivo hacia el interior de los lóbulos hasta la unión córtico-medular, dividiéndolos en lobulillos incompletos. Cada lobulillo consta de una capa externa o corteza y una interna llamada médula. La corteza es más oscura y en ella encontramos 3 tipos celulares: *linfocitos T* inmaduros, también llamados *timocitos*, *células retículoepiteliales*, rodeando a grupos de linfocitos y *macrófagos*. Y en la médula, que es más clara porque tiene menor densidad de linfocitos, se encuentran principalmente células retículoepiteliales, linfocitos T maduros dispersos y los

corpúsculos de Hassall, que están formados por capas concéntricas de células retículoepiteliales aplanadas, llenas de queratina y queratohialina, que en ocasiones pueden calcificarse. Los linfoblastos T, procedentes de la médula ósea ingresan en el timo y van colonizando diferentes zonas del mismo, desde la corteza hacia la médula, a la vez que maduran y se diferencian, adquiriendo su carga antigénica.

Las funciones del timo se describen en la tabla 11.

Órgano linfoide primario esencial para el desarrollo de los linfocitos T
Linfocitopoyesis e inmunogénesis
Control de la función inmunológica de otros órganos linfoides (ganglios, bazo y nódulos).
Sintetiza la hormona timulina, timopoyetina, factor humoral tímico, timosina y otras sustancias necesarias para la formación de linfocitos T.
Antagonista de la función gonadal durante el desarrollo embrionario.
Juega un importante papel en la inmunidad del recién nacido .

Tabla 11. Funciones del Timo.

1.4.3.5. Cambios en el timo tras exposición a campos electromagnéticos.

1.4.3.5.1. Cambios en la morfología del timo.

Existen pocos estudios que valoren cambios morfológicos macro o microscópicos del timo por exposición a campos electromagnéticos. Entre ellos destacar un estudio de exposición a microondas con conejos, donde se demuestra un aumento de sensibilidad de los timocitos a las microondas, induciendo cambios conformacionales, primero a nivel de las membranas y después en la cromatina nuclear (Bogolyubov V.M., 1988). En esta misma línea de estudio, mucho más recientemente, también se han descrito cambios conformacionales a nivel del ADN tras exposición a RF (940 MHz) (Hekmat A.et col., 2013).

Hay estudios en los que han descrito que tras la exposición subcrónica a microondas (2.450 MHz, 5, 15 mW/cm²) se indujo apoptosis de timocitos en ratones, cambios patológicos y afectación en la progresión del ciclo celular, por lo que se

consideró que este tipo de exposición podría inhibir la función inmune en animales (Sun X. et col., 2004). También se ha descrito que exposiciones a largo plazo a ELF-EMF (50 Hz) en ratones acelera la involución fisiológica del timo, mostrando signos de atrofia principalmente por depósito de colágeno y grasa (Quaglino D. et col, 2004).

1.4.3.5.2. Cambios en la secreción del timo. Alteraciones funcionales del timo.

En la literatura apenas hay descritos efectos derivados de exposición a CEM a nivel del timo. Si hay descritos efectos causados por la exposición a CEM, a baja y alta frecuencia, en animales de experimentación a nivel de sistema inmune, como el incremento de la activación fagocítica y la producción de interleukina de los macrófagos (Frahm et col., 2006) así como el efecto inmunosupresor y reducción de las células Natural killer en ratas preñadas a 0,6 W/cm² (Hiroyuki et col., 2003). También se ha descrito que la exposición crónica a CEM, provoca estrés crónico e induce efectos neuroendocrinos en humanos y animales (Liu et col., 2008).

1.5. ESTUDIO DE PARÁMETROS PARA LA MEDIDA DE EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS RADIACIONES ELECTROMAGNÉTICAS.

1.5.1. Determinación experimental de dosimetría (SAR) en sistemas de radiación .

Un índice dosimétrico de efectos biológicos por exposición a campos electromagnéticos es la tasa de absorción específica (SAR), que mide la energía absorbida por unidad de tiempo y por unidad de masa corporal o el ritmo al que un cuerpo absorbe energía cuando está expuesto a radiación de RF. La SAR se emplea como marcador de los límites recomendados para exposiciones a radiofrecuencia según los estándares establecidos por el ICNIRP de 1998.

El cálculo de SAR específico para un tejido es complicado, ya que para su determinación además de las propiedades eléctricas del tejido biológico también hay que tener en cuenta su geometría y tamaño, así como su orientación respecto al campo incidente, la polarización, la frecuencia, el tipo de fuente de radiación, el entorno en el que se produce la exposición y el tiempo de exposición a la radiación incidente, su intensidad y como esté modulada (Sebastián Franco, J.L. et col., 2006).

Actualmente la determinación de SAR se basa en un sistema mixto, de la utilización de métodos computacionales sofisticados, entre ellos destaca el sistema FDTD (Finite-Difference-Time-Domain), basados en modelos numéricos (de animales o humanos) ensamblados a través de cortes del tejido obtenidos por resonancia magnética y de métodos experimentales de medición termométrica de la temperatura corporal.

1.5.2. Marcadores de daño celular en tejidos biológicos.

1.5.2.1. Proteínas de estrés térmico (HSP). Funciones de las proteínas de estrés térmico.

Las HSPs constituyen un sistema celular citoprotector que regula diferentes funciones fisiológicas para mantener el balance homeostático celular en respuesta a situaciones de estrés celular (D'Souza S.M. y Brown I.R., 1998). Así, cuando las células se encuentran bajo un estrés se desencadena una respuesta adaptativa con la activación de la síntesis de HSPs, este incremento en la síntesis es conocido como “respuesta del estrés térmico” y constituye uno de los mecanismos de supervivencia más antiguo y mejor conservado de la naturaleza y probablemente implicado en el proceso de evolución de las diferentes especies.

La respuesta del estrés térmico no sólo se desencadena como respuesta al calor sino también a otras sustancias que pueden resultar tóxicas como metales pesados, privación de glucosa, drogas citotóxicas, alteraciones en el ambiente redox intracelular e infecciones víricas (Feige U. et col., 1996)

Hay un tipo de HSPs que funcionan como chaperonas moleculares y su participación es esencial en los procesos de maduración de proteínas así como en el plegado de otras proteínas recién sintetizadas, desplegado, ensamblaje y translocación a través de las membranas (Becker J. y Craig E.A. 1994; Helmbrecht K. et col., 2000). Estas chaperonas no forman parte de la estructura primaria de la proteína, sino que se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a otra parte de la célula como el retículo endoplásmico o la mitocondria, donde realizarán su función.

1.5.2.1.1. Clasificación de las proteínas de estrés térmico.

Generalmente las HSPs se han clasificado en base a su peso molecular, de este modo se ha establecido un amplio espectro de proteínas de estrés térmico desde menor peso molecular, 20-30 KD, hasta las de mayor peso molecular, de 110 KD. Cada grupo de HSPs desempeña una función principal, por la que se caracteriza.

FAMILIA DE CHAPERONAS	FUNCIÓN PRINCIPAL
HSPs de gran peso molecular (110 KDa)	Disolución de agregados proteicos, inhibición de la agregación de proteínas, termorresistencia.
Hsp90	Control del plegado y actividad de protein-quinasas, receptor esteroideo, factores de transcripción, termotolerancia.
Hsp70	Plegado de proteínas de novo, efecto protector frente a desnaturalización por calor. Más abundante en células eucariotas.
Hsp60	Plegado de proteínas de novo; función inmunogénica como autoantígeno. Abundante en bacterias, cloroplastos y mitocondrias.
Hsp de pequeño peso molecular (20-30 KDa)	Plegado de proteínas, colabora con Hsp70. Predomina en plantas.

Tabla 12. Resumen de las principales familias de HSPs y su función principal (Katschinski, D.M., 2004)

1.5.2.1.2. La proteína de estrés térmico 90 (Hsp90).

La Hsp90 tiene un peso molecular de 90 KDa. Es una chaperona molecular abundante y altamente conservada, que es esencial para la viabilidad en eucariotas (Picard D., 2002), comprende tanto como el 1% - 2% del total de las proteínas celulares en condiciones basales y se incrementa hasta el 4% - 6% de las proteínas celulares bajo distintas situaciones de estrés (Csermeley P. et col., 1998) como temperaturas elevadas, hipoxia/anoxia, radiaciones, exposición a metales pesados, infecciones virales, drogas etc. Entonces la Hsp90 supone un componente funcional principal, dentro de un importante complejo de chaperonas del citosol, y está envuelta en diferentes procesos celulares como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Está también asociada con varias

proteínas celulares como los receptores de hormonas esteroideas (Grad, I. y Picard, D., 2007). La expresión de la Hsp90 es más alta en procesos de proliferación celular que en tejidos normales y permite a células tumorales tolerar alteraciones que podrían ser letales. Se expresa mayoritariamente a nivel del citoplasma y una pequeña proporción en el núcleo celular, que bajo situaciones de estrés térmico se incrementa ligeramente (Van Bergen P.M., 1987).

Se han identificado 5 isoformas de Hsp90 en células humanas, según su localización celular, de ellas las dos isoformas citoplasmáticas principales son: Hsp90 α (forma inducible / forma mayor) y la Hsp90 β (forma constitutiva / forma minor) (Sreedhar A.S. et col., 2004; Csermeley P. et col., 1998).

Cada isoforma de Hsp90 presenta diferentes papeles en el desarrollo y diferenciación celular. La isoforma Hsp90 α se expresa fundamentalmente de forma inducible y la isoforma Hsp90 β se expresa mayoritariamente de forma constitutiva, aunque ambas pueden realizar la mayoría de las funciones con las que se relaciona. Además la sobreexpresión de la isoforma Hsp90 α se ha relacionado con la progresión de diversos tipos de tumores y por este camino va orientada la investigación para el tratamiento del cáncer, la regulación del ciclo celular y con la estimulación de factores de crecimiento activando la vía tirosina-kinasa. Así mismo, la isoforma Hsp90 β se ha visto implicada en la adaptación celular a largo plazo (Sreedhar A.S. et col., 2004).

ISOFORMA	FUNCIÓN ESPECÍFICA	EXPRESIÓN
Hsp90α	Promueve el crecimiento Regulación del ciclo celular Inducción bajo condiciones de estrés Citoprotección	Inducible
Hsp90β	Desarrollo embrionario temprano Maduración de células germinales Transformación celular Transducción de señal Adaptación celular a largo plazo	Constitutiva

Tabla 13. Isoformas mayores de la Hsp90, diferencias en la función y expresión (Sreedhar A.S., 2004).

La Hsp90 no actúa de forma independiente sino, que precisa unirse a otras proteínas conocidas como cochaperonas, constituyendo un complejo multiproteico funcional. Estas cochaperonas en su mayoría actúan regulando la actividad ATPasa de extremo N-terminal de la Hsp90 (Katschinski D.M. 2004; Brown M.A. et col., 2007). Es a través de esta unión que la Hsp90 puede funcionar como chaperona molecular, actuando como catalizador en la maduración o activación de más de 100 proteínas conocidas como “proteínas cliente”, que intervienen en la homeostasis celular (Pearl L.H. et col., 2008). Estas proteínas clientes se clasifican en tres grandes grupos: a) Proteín-quinasas; b) Factores de transcripción; c) grupo de proteínas emergentes, de la replicación viral y proteínas-receptoras intracelulares, relacionadas con la inmunidad innata (Pearl L.H. et col., 2008).

Además de las funciones más estudiadas de la Hsp90 como chaperona molecular, se está investigando recientemente su relación en determinadas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas y sobre todo en el desarrollo del cáncer, donde se están realizando múltiples ensayos utilizando fármacos inhibidores de Hsp90 como la Geldanamicina (Waza M. et col., 2006; Taylor D.M. et col., 2007; Powers M.V. 2007; Rodina A. et col., 2007; Pearl L.H. y col., 2008).

1.5.2.1.2.1. Expresión de Hsp90 en tejido glandular en condiciones basales y bajo estrés.

La glándula tiroides es uno de los órganos más sensible a la radiación (Duffy B.J. y Fitzgerald P., 1950). Las HSPs se ha visto que son liberadas después del calentamiento por exposición a microondas, causando o no calentamiento (Kwee S., 2004; Daniells J.A. et col., 1997). También se han observado cambios en la función de la glándula tiroides en respuesta a cambios en la temperatura ambiente y puede ser estimulada directamente por calentamiento con microondas provocando cambios en su actividad (Magin RL et col., 1977).

En los últimos años una de las líneas de investigación sobre terapia anticancerígena está dirigida específicamente a la proteína Hsp90. Se ha observado que muchas de las proteínas cliente que regula la Hsp90 están relacionados con el desarrollo de cáncer de tiroides (Park J-W. et col., 2003; Goetz M.P. et col., 2003; Bagatell R. y Whitesell L., 2004).

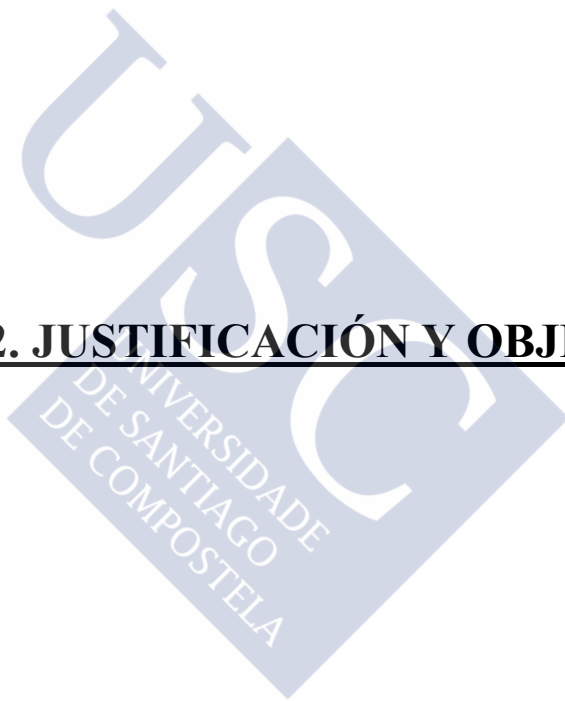
En estudios in vitro también se ha demostrado que la exposición, de líneas celulares de tirocitos humanos, a estrés como la hipertermia o el arsénico muestra incremento de la expresión de Hsp90 y su relación con la patogénesis de enfermedades autoinmunes (Youde S.J. et cols., 1998).

1.5.2.1.2.2. Expresión de Hsp70 en tejido glandular.

La proteína Hsp70 se expresa en el citoplasma, sus niveles se incrementan tras la exposición a campos electromagnéticos solos o asociados a otros elementos estresantes (Cairo P. et col., 1998; Daniells C. et col., 1997; Tsurita G et col., 1999; Chow K.y Tung W.L, 2000). Cuando la exposición a campos electromagnéticos se produce en largos periodos o de forma repetitiva, los niveles de Hsp70 descienden y con ello su capacidad citoprotectora (Lin T.N. et col., 1996; di Carlo A et col., 2002). Esta proteína también se ha relacionado con la isquemia aguda miocárdica, en tumores con resistencia a los fenómenos antiapoptóticos con incremento de bcl-2 y de p53 y enfermedades autoinmunes de tiroides (Weetman A.P. y McGregor,A.M., 1984; Ratanachaiavong S. et col., 1991).

En un estudio in vitro Youde demostró que la exposición, de líneas celulares de tirocitos humanos, a estrés como la hipertermia o el arsénico, expresaba incremento de la de Hsp70, así como su relación con la patogénesis de enfermedades autoinmunes (Youde S.J. et col., 1998).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





2.1. JUSTIFICACIÓN.

Con el intenso desarrollo tecnológico de las últimas décadas, se ha incrementado el interés por el estudio de los efectos derivados de la exposición a radiaciones no ionizantes. Sobre todo tras la publicación de estudios que asociaron la exposición a campos electromagnéticos con efectos adversos para la salud. Aunque en los efectos biológicos de este tipo de radiación sólo se han tenido en cuenta aquellos derivados por el incremento de temperatura, se han observado también ciertos efectos biológicos que no pueden ser explicados por el incremento de temperatura. Esto ha abierto una nueva vía de estudios sobre la interacción de las radiaciones no ionizantes con los tejidos biológicos, aspecto importante, ya que cada vez estamos expuestos a más fuentes de radiación no ionizante y con más frecuencia, pudiendo constituir un riesgo potencial para la salud de los seres vivos.

En el campo de la Medicina Física y Rehabilitación se utilizan las microondas con fin terapéutico, principalmente por su efecto analgésico. El efecto terapéutico de los campos electromagnéticos en los tejidos humanos es empleado sobre todo por el calentamiento y vasodilatación local. Sin embargo, los efectos subtérmicos tisulares en los trabajadores que las aplican y los pacientes, después de ser sometidos a la acción de las microondas son desconocidos.

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un estudio experimental con animales de laboratorio expuestos a radiación con microondas, con la frecuencia de radiación de 2,45 GHz, empleada en terapéutica médica, concretamente dentro del ámbito de la Medicina Física, utilizando valores de SAR subtérmicos. Para ello analizamos, en un modelo experimental de diatermia en ratas, las modificaciones que tienen lugar en la morfología y expresión de proteínas de estrés térmico en la glándula tiroidea y en el timo, después de la exposición aguda y/o repetida a radiofrecuencia a 2,45 GHz en un sistema experimental conectado a una cámara Gigahertz Transverse Electromagnetic (GTEM).

2.2. OBJETIVOS.

Los objetivos por los que realizamos esta tesis son los expuestos a continuación:

1. Obtener un modelo experimental de radiación subtérmico en ratas Sprague-Dawley de exposición localizada mediante un sistema de radiación controlada en una cámara de radiación GTEM.

2. Determinar la variabilidad de la respuesta de las proteínas Hsp90 y Hsp70 como marcadores biológicos, en la glándula tiroides y en el timo, como expresión de daño celular tras la exposición a radiación no ionizante.

Las proteínas de estrés térmico se han utilizado de forma extensa como marcadores biológicos de estrés o daño celular en procesos patológicos o toxicológicos. En esta tesis se utilizan como biomarcadores las proteínas de estrés térmico 90 (Hsp90) y 70 (Hsp70) del tejido glandular de tiroides y timo.

3. Determinar las diferencias de vulnerabilidad del efecto citoprotector de las chaperonas Hsp90 y Hsp70, en la glándula tiroides y en el timo, ante la exposición a radiación no ionizante.

La exposición a campos electromagnéticos provoca cambios en los niveles de Hsp90 y Hsp70, lo que conlleva cambios en su capacidad citoprotectora.

4. Estudiar los cambios morfológicos en la glándula tiroides y en el timo después de la aplicación de radiación con microondas, mediante un sistema de radiación que nos permita controlar la exposición de forma precisa, en animales de experimentación a una frecuencia de 2,45 GHz, utilizada en terapia física.

Existen multitud de estudios dedicados a la investigación de los efectos biológicos sobre la interacción de la radiación no ionizante con distintos tejidos, pero resulta difícil extraer conclusiones e incluso poder realizar comparaciones entre los estudios, debido a la gran heterogeneidad en relación a los parámetros de tiempos de exposición, frecuencia e intensidades y potencias de radiación, presentes en cada uno de ellos. Todo esto, determina que hasta el momento no se hayan establecido unos efectos biológicos derivados de la interacción de los tejidos con las radiaciones no

ionizantes. En este sentido, esta Tesis está dirigida a detectar cambios estructurales en tejido glandular de tiroides y timo tras exposición a radiación no ionizante de microondas con frecuencias y potencias utilizadas en diatermia.

5. Valorar el efecto de la radiación aguda en el tejido glandular tiroideo y del timo en relación a distintos parámetros electromagnéticos como la intensidad y el tiempo de exposición a la radiación.

Para esto se ha utilizado un tiempo de exposición de 30 minutos, que se emplea habitualmente en terapéutica. Y además, también se han estudiado los cambios desarrollados al cabo de 90 minutos y 24 horas después de la exposición, para poder determinar si los cambios se mantienen o si existen distintos grados de recuperación.

6. Valorar el efecto de la exposición repetida a radiación con microondas en el tejido glandular tiroideo.

Dado que, en el medio en el que nos desenvolvemos, lo habitual son las exposiciones a radiaciones repetidas e incluso múltiples, hemos estudiado los efectos biológicos que pueden derivar de exposiciones repetidas, durante diez días en 2 semanas, a la radiación con microondas a 2,45 GHz.

7. Calcular la Tasa de energía absorbida (SAR) en los animales expuestos a radiación con microondas.

Para la interpretación y valoración de los resultados sobre los efectos biológicos fue imprescindible la determinación de SAR térmico o no térmico, ya que la SAR determina el índice biológico de la interacción de la radiación no ionizante con los tejidos estudiados y nos permite cuantificar la energía absorbida en W/Kg.

La determinación de SAR se realizó con una combinación de metodología experimental y cálculo FDTD mediante fantomas numéricos. Al mismo tiempo la medición de temperaturas rectales con sonda termométrica sirvió para cuantificar niveles de estrés. Esta información sirvió para cuantificar niveles de estímulos aplicados a los animales de experimentación.





3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1. ANIMALES.

En la elaboración de esta tesis se emplearon un total de 246 ratas hembras adultas Sprague–Dawley de un peso medio aproximado de 240 gr.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa nacional vigente, según el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE núm. 252, viernes 21 de octubre 2005, 34367). Posteriormente, durante la realización de los experimentos, la Comunidad Económica Europea, estableció la Directiva Europea 2010/63/EU relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos (Boletín Oficial de la Unión Europea, de 20 de octubre 2010, L 276/33), en vigor a nivel nacional desde febrero de 2013, a través del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, de 2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE núm. 34, viernes 8 de febrero de 2013 Sec. I pág. 11370). Los permisos los obtuvimos del Comité de Bioética local de nuestra universidad (USC).

Los animales fueron alojados en jaulas (4-5 por jaula) se mantuvieron en condiciones ambientales de temperatura $21\pm 1^\circ$, permaneciendo en ciclos de luz/oscuridad 12:12 h. Tenían acceso libre en cada jaula a alimentos y agua.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

3.2.1. EXPERIMENTO 1: Estudio de la expresión de Hsp-90 α/β y Hsp-70 y de la actividad apoptótica en la glándula tiroides de ratas expuestas a radiación con microondas a 2,45 GHz.

El objetivo de este estudio fue determinar la variabilidad de la respuesta de las proteínas Hsp90 y Hsp70 como marcadores biológicos en la glándula tiroides, así como las diferencias de vulnerabilidad del efecto citoprotector de las chaperonas ante la exposición a radiación no-ionizante. Este estudio se realizó teniendo en cuenta la tasa de absorción específica (SAR) en el tejido glandular, tiroideo, mediante el cálculo FDTD.

Diseño experimental

Se utilizaron un total de 96 ratas hembra Sprague-Dawley repartidas por igual dentro de los siguientes grupos:

Grupo A (n = 48): Las ratas se dividieron en 4 subgrupos (n=12); cada rata fue expuesta a la radiación de microondas durante 30min.*, a diferentes niveles de potencia: 0 (el grupo control), 1,5, 3 y 12 W**. Las ratas se mantuvieron vivas durante 90 min ***, después se sacrificaron y perfundieron con fijador.

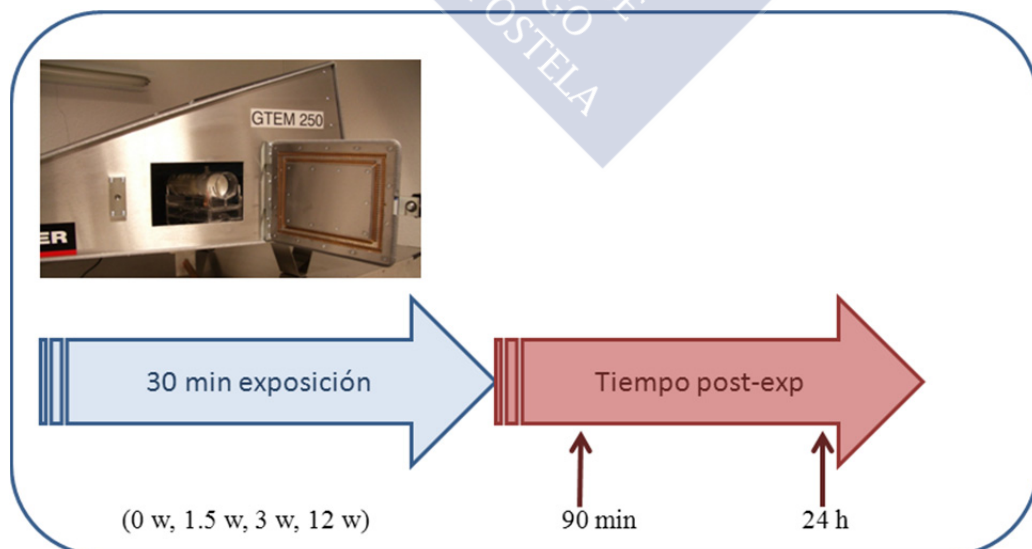
Grupo B (n = 48): Las ratas se dividieron en 4 subgrupos (n=12); cada rata fue expuesta a la radiación de microondas durante 30 min.*, a diferentes niveles de potencia: 0(el grupo control), 1,5, 3 y 12 W**. Las ratas se mantuvieron vivas durante 24 h ***, después se sacrificaron y perfundieron con fijador (paraformaldehido).

*El tiempo de exposición mínimo fue testado previamente. Inicialmente se hizo exposición de animales a 15 y 30 minutos.

**En este experimento se usaron niveles de potencia de 1,5, 3, 12 W, como múltiplos de la potencia inicial (x2 o x8); y 12 W fue la potencia máxima del amplificador.

***Se eligieron los 90 min postradiación, como el momento de sacrificio para los animales del grupo A, porque la expresión máxima de las proteínas Hsp90 y Hsp70 es en este momento. Los animales del grupo B se sacrificaron 24 h después de la radiación, el cual está generalmente reconocido como el intervalo de recuperación.

Características de la exposición



Esquema 3. Representación esquemática del proceso experimental 1 en los grupos A y B expuestos a radiación MO.

3.2.2. EXPERIMENTO 2: Efecto de la radiofrecuencia aguda y repetida a 2,45 GHz en la morfología de la glándula tiroides de rata.

Diseño experimental

Se utilizaron un total de 54 ratas hembras Sprague –Dawley de un peso aproximado de 230-250 gr. Para su estudio se distribuyeron equitativamente en los siguientes grupos:

Grupo A: Animales con una **exposición aguda de radiación y estudiados 90 minutos** después de la radiación. (n= 18): las ratas fueron divididas en 3 subgrupos (n=6); cada rata estuvo expuesta 30 min * a radiación con microondas a diferentes niveles: 0 (control), 3 y 12 W**. Las ratas fueron mantenidas con vida durante 90 min ***, luego se sacrificaron y perfundieron con paraformaldehído.

Grupo B: Animales con una **exposición aguda de radiación y estudiados 24 horas** después de la radiación. (n= 18): las ratas fueron divididas en 3 subgrupos (n=6); cada rata estuvo expuesta 30 min* a radiación con microondas a diferentes niveles: 0 (control), 3 y 12 W**. Las ratas fueron mantenidas con vida durante 24 h ***, luego se sacrificaron y perfundieron con paraformaldehído.

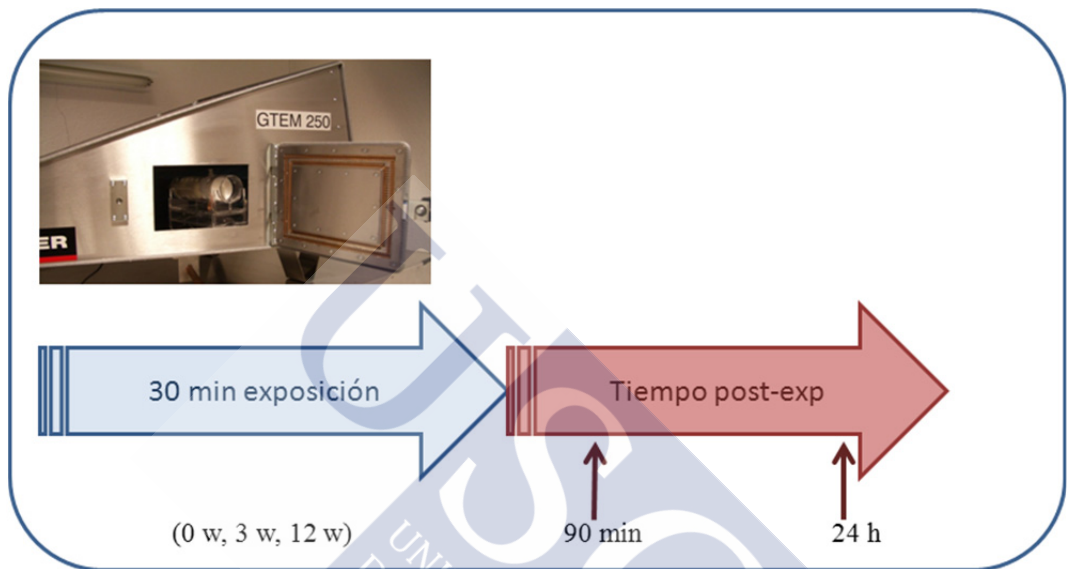
Grupo C: Animales con **exposiciones repetidas y estudiados 90 minutos** después de la radiación. Un subgrupo (n=18) fue radiado a 3 W durante 30 min cada día, un total de 10 días durante un periodo de 2 semanas. El último día de la exposición, las ratas fueron radiadas, luego sacrificadas y perfundidas con paraformaldehído, después de 90 min (para la expresión de Hsp90).

El grupo control de ratas no radiadas estuvo inmovilizado para cada una de las 10 sesiones y sacrificado el último día, siguiendo el mismo protocolo como los animales radiados.

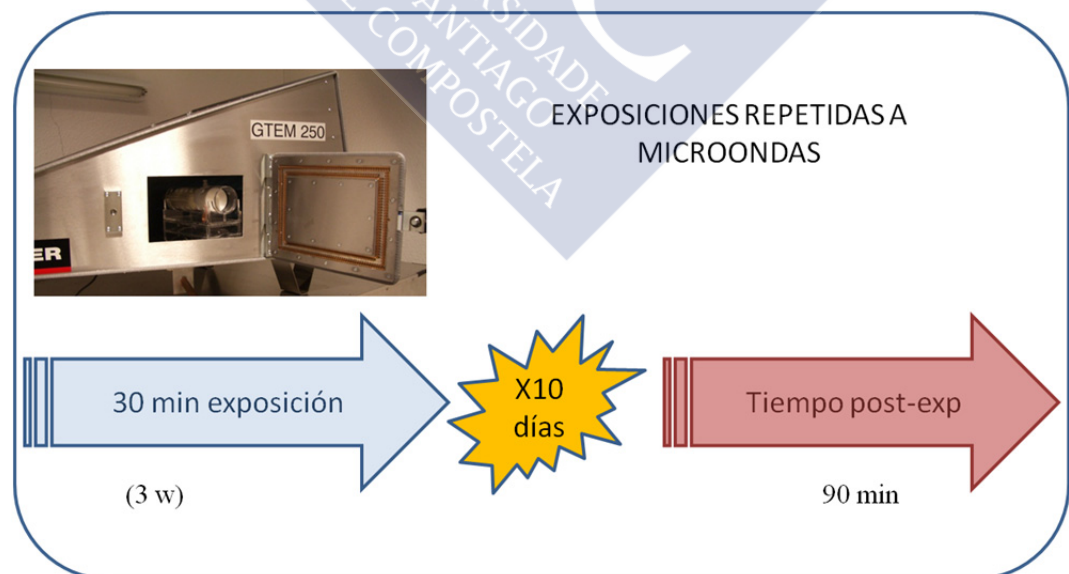
Características de la exposición

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

(a)



(b)



Esquema 4. Representación esquemática del proceso experimental 2, de la fase de exposición aguda (a) y de la fase de exposiciones repetidas (b).

3.2.3. EXPERIMENTO 3: Estudio de la radiofrecuencia aguda a 2,45 GHz en la expresión de las proteínas Hsp90 Y Hsp70 y en la morfología del timo de rata.

En este estudio nuestro objetivo fue determinar la variabilidad de la respuesta de las proteínas Hsp90 y Hsp70 como marcadores biológicos en el timo, así como los cambios morfológicos ante la exposición a radiación no ionizante. Este estudio se realizó teniendo en cuenta la tasa de absorción específica (SAR) en el tejido del timo, mediante el cálculo FDTD.

Diseño experimental

Se utilizaron un total de 96 ratas hembra Sprague-Dawley repartidas por igual dentro de los siguientes grupos:

Grupo A (n = 48): Las ratas se dividieron en 4 subgrupos (n=12); cada rata fue expuesta a la radiación con microondas durante 30 min.*, a diferentes niveles de potencia: 0 (el grupo control), 1,5, 3 y 12 W**. Las ratas se mantuvieron vivas durante 90 min ***, después se sacrificaron y perfundieron con paraformaldehído.

Grupo B (n = 48): Las ratas se dividieron en 4 subgrupos (n=12); cada rata fue expuesta a la radiación con microondas durante 30 min.*, a diferentes niveles de potencia: 0 (el grupo control), 1,5, 3 y 12 W**. Las ratas se mantuvieron vivas durante 24 h ***, después se sacrificaron y perfundieron con fijador.

*El tiempo de exposición mínimo fue testado previamente.

**En este experimento se usaron niveles de potencia de 1,5, 3, 12 W, como múltiplos de la potencia inicial (x2 o x8); y 12 W fue la potencia máxima del amplificador.

***Se eligieron los 90 min postradiación, como el momento de sacrificio para los animales del grupo A, porque la expresión máxima de Hsp90 y Hsp70 ocurre en este momento. Los animales del grupo B se sacrificaron 24 h después de la radiación, el cual está generalmente reconocido como el intervalo de recuperación.

Grupos Experimentales	POTENCIA/TIEMPO POSTRADIACIÓN			
Grupo A	0 W/90 min	1,5 W/90 min	3 W/90 min	12W/90 min
Grupo B	0 W/24 h	1,5 W/24 h	3 W/24 h	12 W/24 h

Tabla 14. Distribución de los grupos y subgrupos en relación con la potencia de radiación y el tiempo post-exposición a microondas.

3.3. RADIACIÓN CON MICROONDAS EN CAVIDAD EXPERIMENTAL (GIGAHERTZ TRANSVERSE ELECTROMAGNETIC: GTEM). CÁLCULO DE SAR.

3.3.1. 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 6 x 1,8 cm 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 utilizado en esta tesis está compuesto por los siguientes elementos: Los elementos que constituyen el sistema de radiación son:

- Cámara GTEM Schaffner 250
- Generador Vectorial de Señales
- Amplificador
- Acoplador Direccional
- Analizador de Espectro
- Medidor de Potencia
- Cápsula contenedora.

La cavidad metálica de radiación presentaba las siguientes dimensiones 6,95 x 3,58 x 2,55cm/1,00 x 1,30cm/1,10 x 1,10 x 1,10cm/0,85 x 0,85 x 0,45cm.

La señal del Generador Vectorial de Señales (GVS) alimenta al amplificador (AMP) con una señal sinusoidal pura de 2.450 MHz regulada a la potencia requerida durante la irradiación. La salida procedente del amplificador se conecta con el Acoplador

Direccional (AD) para pasar directamente a la Cámara de Radiación GTEM, donde se sitúa la Rata (R) irradiada, situada en la zona de máxima uniformidad del campo (catálogo de Schaffner) e inmovilizada mediante un cepo de metacrilato (CR), siendo la pata delantera izquierda del animal la que recibe la máxima radiación. El AD permite medir los valores de potencia incidente (P_{IN}) y potencia 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 incidente sobre R en la dirección K con los vectores E y H posicionados perpendicular y paralelamente al eje principal de R respectivamente. De este modo a la izquierda de R recibe la máxima amplitud de campo, produciendo apantallamiento en la zona derecha. Ya 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:

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

siendo h la altura de la bóveda (*septum*) en la zona de exposición (posición de la CR), (ver fig. 9); P_{IN} la potencia de entrada en la GTEM; $Z_0 = 50 [\Omega]$ la impedancia de entrada de la GTEM y ζ un coeficiente que depende del rizado del campo dentro de la zona de posicionamiento de CR¹, considerado igual a 2 (en 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.

¹ Este factor también depende de la modulación de la señal, aunque en este caso no tiene influencia ya que la señal es sinusoidal pura.

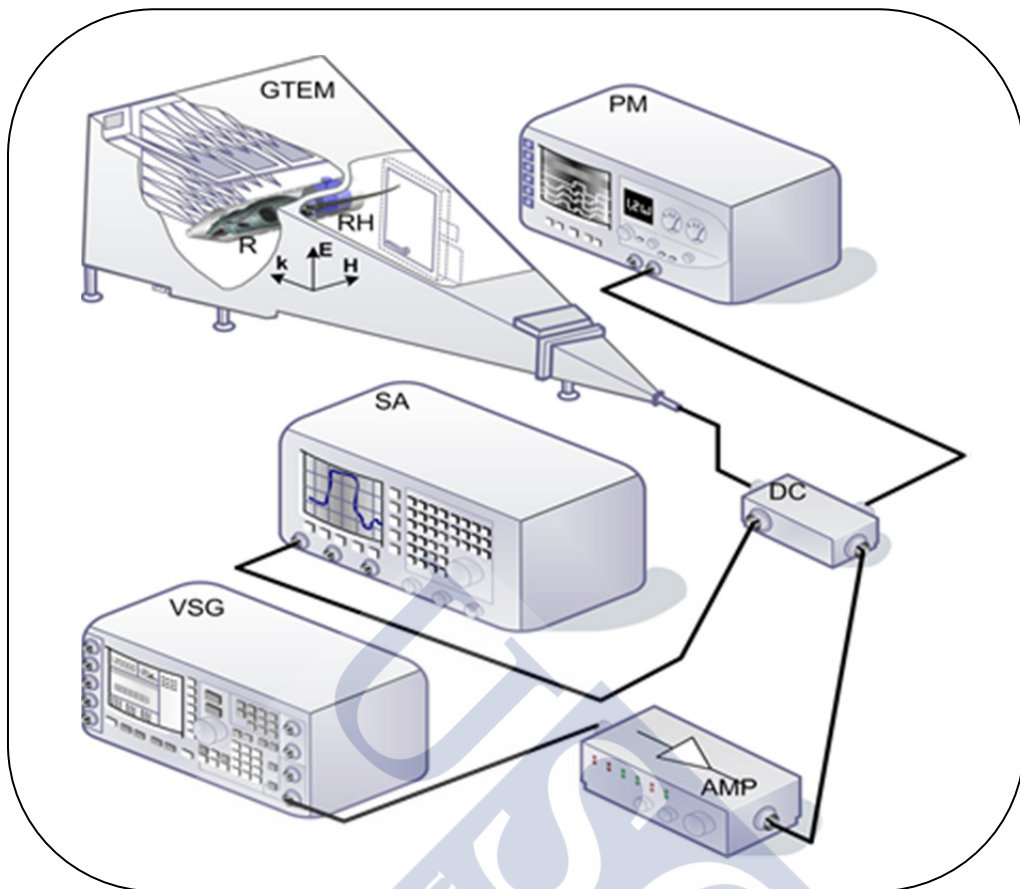


Figura 9. Esquema del sistema de radiación microonda utilizado. GTEM: Cámara GTEM Schaffner 250; GSV Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4 GHz); AMP: Amplificador Aethercomm 0.8-3.2-10; Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz); AE: Analizador de Espectro Aligent E4407B (9KHz-26,5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

3.3.2. Descripción de las simulaciones y cálculo del SAR mediante SEMCAD.

Los valores de SAR se estimaron, en esta tesis, con la ayuda del SEMCAD X (Schmid and Partner Engineering AG., 2009) y un software basado en el sistema FDTD. Para ello, se utilizó un modelo numérico de rata Sprague-Dawley de 198,3 g (modelo R8, Schmid & Partner Engineering., 2009), 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. El valor de campo \mathbf{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 de 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.

3.4. ESTUDIO DE LA DETERMINACIÓN TÉRMICA EXPERIMENTAL DURANTE LA RADIACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE ESTRÉS.

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

La temperatura se midió con un termómetro digital Temp JKT (instrumentos Eutech). Las mediciones se realizaron en los siguientes momentos: antes de colocar al animal en la cámara de radiación, inmediatamente después de la exposición, 30, 60, 90 min y 24 horas después de la radiación (cuando los animales fueron sacrificados), el caso de estudio de la glándula tiroides.

Y en el caso de estudio del timo inmediatamente después de finalizar la exposición, es decir, en el minuto 0, a los 90 min y 24 horas después de la irradiación (cuando los animales fueron sacrificados). El seguimiento de la temperatura rectal de los animales en cada grupo (radiados y no radiados) nos permitió determinar los cambios temporales en los niveles de estrés corporal, así como las diferencias en las respuestas entre los animales de experimentación.

3.5. TÉCNICA GENERAL DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

3.5.1. 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 transcurridos estos tiempos se procedió a la extracción del tejido de la glándula tiroides o del timo bajo una lupa Nikon Eclipse CFI60, tras anestesiar al animal profundamente con pentotal sódico, posteriormente se procedió al sacrificio de los animales. Una vez extraída la glándula tiroidea o el timo, se almacenó a -30°C para su uso.

3.5.2. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay).

3.5.2.1. Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína en los extractos de tejido fue determinado por el método Bradford con un kit Bio-Rad Protein Assay (BioRad Laboratories, Germany), con BSA (Sigma-Aldrich, España) como estándar.

3.5.2.2. ELISA.

Una vez extraído el tejido y conservado a -30°C , se realizó la lisis de los tejidos con un kit comercial (ProteoJet Mammalian cell lysis Reagent, Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se efectuó la cuantificación de la proteína en los extractos de cada muestra utilizando el kit Bio-Rad Protein Assay (BioRad Laboratories), utilizando como proteína estándar seroalbúmina bovina (BSA). Se añadió $1\ \mu\text{g}$ de cada muestra a cada pocillo de placas ELISA de poliestireno (Iwaki) y se incubó durante toda la noche a 4°C con $100\ \mu\text{l/pocillo}$ de tampón de acoplamiento (Na_2CO_3 $0,015\ \text{M}$, HNaCO_3 $0,035\ \text{M}$, 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 $50\ \text{mM}$, NaCl $0,15\ \text{M}$, pH 7,2) conteniendo un 0,2% de Tween 20 y un 5% de leche desnatada. Tras un lavado con PBS se adicionó a las placas una dilución 1/200 del anticuerpo monoclonal anti-Hsp90 y anti-Hsp70 (Santa Cruz Biotechnology) y se incubó

durante 1 h a 37° C. Tras varios lavados con PBS, se adicionó una dilución 1/2000 de un anticuerpo policlonal de conejo anti-Igs de ratón (Dakopatts) y se incubó durante 1 h a 37°C. Finalmente, las placas fueron lavadas con PBS y se adicionó un sustrato compuesto de 0,04% de ortofenilendiamina (Sigma) en tampón fosfato-citrato (Na_2HPO_4 0,2 M, ácido cítrico 0,1 M; pH 5,0) y 0,001% de H_2O_2 . La reacción se paró a los 20 min de incubación añadiendo H_2SO_4 3 N y las densidades ópticas (DO) fueron leídas en un lector ELISA con pocillos de 492 nm.

3.6. TÉCNICAS GENERALES DE TINCIÓN E INMUNOHISTOQUÍMICA.

3.6.1. Perfusión y procesamiento del tejido.

Después de la exposición de los animales a la radiación con microondas en la cámara GTEM durante 30 minutos y de esperar el tiempo post-exposición según el grupo de estudio, se procedió al traslado al laboratorio de perfusión. Una vez anestesiados los animales con pentotal sódico (10 mg/1ml) fueron perfundidos transcárdialmente vía aorta ascendente, primero con suero salino al 0,9% durante 30 segundos para el lavado de los vasos y después con paraformaldehído frío al 4% en tampón fosfato 0,1 M de pH 7,4. Finalmente se realizó la extracción del tejido de la glándula tiroides bajo una lupa Nikon Eclipse CFI60 y se almacenó en paraformaldehído a - 30° durante 24 horas.

3.6.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E).

El tejido glandular, de tiroides y timo, se incluyeron en bloques de parafina y se cortaron con microtomo en secciones de 4 μ de grosor, posteriormente se desparafinaron en un horno durante 30 min a 60°. Las secciones fueron entonces introducidas en xilol durante 15 min, tras los cuales el tejido fue hidratado alternativamente en alcohol de 96° y 70° durante periodos de 5 minutos, con un aclarado final en agua destilada. La tinción con Hematoxilina fue aplicada durante 5 minutos, seguida de un aclarado final en agua de 3 minutos. La tinción con Eosina fue aplicada durante un minuto y después la deshidratación fue llevada a cabo con alcohol de 70°, 96° y 100°. Finalmente, las muestras fueron sumergidas en xilol y montadas en portaobjetos. Se examinaron bajo microscopio

3. MATERIAL Y MÉTODOS

óptico buscando signos de lesiones en las células foliculares, parafoliculares, tejido conectivo y coloide de la glándula tiroides. Así como lesiones a nivel de células retículoepiteliales y linfocitos T del timo.

3.6.3. Tinción de núcleos con DAPI.

Tras la extracción de la glándula tiroides, el tejido fue fijado en paraformaldehído durante 24 horas, aclarado en alcoholes y tolueno, colocados en bloques de parafina y posteriormente cortados en secciones de 5-6 micras de grosor. Estas secciones fueron aclaradas en lavado PBS e incubados con 0.8 mg/ml de 4', 6-diamidina-20-fenilindol dihidroclorato (DAPI; Sigma-Aldrich) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados en PBS, las secciones fueron montadas en PBS/glicerina. La tinción con DAPI de los tejidos fue visualizado por microscopía de fluorescencia.

3.6.4. Inmunohistoquímica.

3.6.4.1. Técnica general de inmunohistoquímica simple.

Inicialmente se sometieron las secciones a un periodo de preincubación de una hora en suero normal de conejo diluido al 10% y 0,25% de Tritón X-100 en 0,02 M de tampón fosfato potásico salino (KPBS). Las secciones se incubaron toda la noche (con periodo mínimo de incubación de 16 horas) con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Hsp90 (de Santa Cruz Biotechnology) diluido en KPBS al 1% de suero normal. Al día siguiente las secciones se lavaron varias veces para eliminar el antisuero no diluido y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo anticonejo biotilado (de Vector, Burlingame, CA, USA) en KPBS a una concentración 1:500. Las secciones marcadas con biotina se lavaron con KPBS 3 veces y se incubaron posteriormente otros 30 minutos con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (DAKO, Glostrup, Denmark), diluido a 1:100 en KPBS conteniendo 0,25 % de Tritón. Finalmente se realizó el revelado en una solución de imidazol- HCl tamponado con H₂O₂ (DAKO) 0,04% de peróxido de hidrógeno y 0,5% 3-3'diamino bencidina (DAB).

3.7. MEDICIÓN DE PARÁMETROS HISTOLÓGICOS, CUANTIFICACIÓN Y ESTADÍSTICA:

3.7.1. EXPERIMENTO 1:

Se utilizó un lector ELISA con pocillos de 492 nm para cuantificar la Hsp90 y Hsp70.

Los signos de apoptosis fueron cuantificados usando un microscopio de fluorescencia Zeiss con aumento de 100X, con 100 células por campo examinado para signos de apoptosis en cada muestra (3 secciones por animal) en cada uno de los grupos estudiados.

Los resultados en el texto y figuras están expresados como medias y error estándar de la media ($M \pm EEM$). ($p < 0.05$).

Fueron aplicados los siguientes test estadísticos:

- 1) Para estudiar los valores de las tasas de absorción específica, promedio o pico en los cuerpos y en las glándulas tiroides de las ratas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (Tabla 15) seguido por un test de Holm-Sidak.
- 2) Un ANOVA de 2 vías para evaluar las diferencias significativas en las concentraciones de Hsp90 y Hsp70 en la glándula tiroides, seguido por un test de comparación múltiple de Holm-Sidak. Los factores tomados en consideración fueron potencia usada durante la exposición a radiación (0, 1,5, 3 y 12 W) y el tiempo transcurrido entre radiación y sacrificio de los animales (90 min y 24 horas).

Las transformaciones de logaritmos naturales se aplicaron cuando se necesitó obtener normalidad y homocedasticidad.

3.7.2. EXPERIMENTO 2:

Los resultados de este trabajo, en el texto y figuras, se expresaron como $M \pm EEM$

($p < 0.05$). Para analizar los resultados se aplicaron los siguientes test estadísticos: 1) Un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para analizar los valores promedio y pico de las tasas de absorción específicas de los animales en los cuerpos y en las glándulas tiroides a las distintas potencias (Tabla 17), seguido por un test de Holm-Sidak.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

2) Las mediciones morfológicas, que se llevaron a cabo, fueron en el diámetro de los folículos centrales y periféricos y en el tamaño de los tabiques de tejido conectivo central y periférico, en las secciones de inmunohistoquímica de Hsp90 a un aumento de 40 X. Se midieron 2-3 secciones por animal y grupo. Los resultados se analizaron con los siguientes test estadísticos:

2.1) Se realizó el test estadístico de análisis de la varianza de 3 vías para la valoración de la significación estadística entre exposición aguda, de los grupos A y B, teniendo en cuenta las siguientes variables: (a) considerando la radiación (no radiado, radiado), (b) considerando la potencia (3 o 12 W), y (c) considerando el tiempo postradiación (90 min o 24 h).

2.2) También se llevó a cabo un ANOVA de dos vías, teniendo en cuenta los factores Radiación X Tiempo post exposición.

2.3) Un ANOVA de una vía, donde se tuvo en cuenta solo la radiación (Radiados/no radiados).

3) Se utilizó un ANOVA de 2 vías para evaluar las diferencias significativas en los parámetros (diámetro de los folículos centrales/periféricos o grosor de tabique central/periférico) entre exposiciones agudas, grupos A y B, y exposiciones repetidas, grupo C, seguidas de un test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. Los factores considerados fueron la potencia usada durante la exposición (3 o 12W) y el intervalo de tiempo entre la radiación y el sacrificio de los animales (90 min o 12 h.)

Se aplicaron transformaciones de logaritmos naturales cuando se necesitó obtener normalidad y homocedasticidad. Se utilizaron los test de Tukey o Bonferroni HSD para comparaciones a posteriori.

3.7.3. EXPERIMENTO 3:

1) Los resultados de SAR, promedio y pico para los cuerpos y los timos de las ratas, se muestran en la tabla 24 y están expresados en forma de $M \pm EEM$; las diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron determinados por un ANOVA de una vía, para las potencias de radiación (1,5, 3 y 12 W) como factor de estudio, seguidos por el test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

2) Se utilizó un ANOVA de 2 vías para evaluar los niveles de estrés en relación a la temperatura. Los factores considerados fueron la potencia de radiación (0, 1,5, 3 y 12 W) y el tiempo antes y después de la irradiación (0 y 90 min o 24 h).

3) Los resultados de ELISA (figura 20) fueron determinados con un ANOVA de 2 vías considerando el promedio de la concentración en los tejidos para cada anticuerpo (Hsp90 y Hsp70) teniendo en cuenta 2 factores, la potencia de radiación (0, 1,5, 3 y 12 W) y el tiempo transcurrido después de la radiación (90 min o 24 h). Seguidos por el test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

4) Los resultados morfológicos obtenidos de los recuentos (número de vasos en médula, células retículoepiteliales con aspecto hemorrágico, glóbulos rojos y la relación entre corteza-médula) en secciones de timo teñidas con H-E se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, considerando dos factores, potencia de radiación (0, 1,5, 3 y 12 W) y el tiempo transcurrido después de la radiación (90 min o 24 h) seguido de comparaciones múltiples obtenidas a partir del test de Bonferroni.

Se aplicaron transformaciones de logaritmos naturales cuando se necesitó obtener normalidad y homocedasticidad. Los test de Tukey o Bonferroni HSD si fue necesario.





4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





4.1. EXPERIMENTO 1

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE Hsp90 α/β y Hsp70 Y DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA EN LA GLÁNDULA TIROIDES DE RATAS EXPUESTAS A RADIACIÓN CON MICROONDAS A 2,45 GHz.



4.1.1. INTRODUCCIÓN.

A lo largo de las últimas décadas, en numerosos estudios científicos se han descrito cambios en parámetros biológicos después de la interacción con campos electromagnéticos (CEMs) en organismos vivos. La población general está expuesta diariamente de forma silenciosa a numerosas fuentes de radiación no ionizante. Debido a la susceptibilidad individual o a exposición laboral ciertos segmentos de la población están menos protegidos.

Numerosos estudios epidemiológicos y experimentales han sido llevados a cabo para evaluar el riesgo de cáncer (Wakeford, 2004), efectos sobre el sistema nervioso (Regel y Achermann P., 2011), efectos hematológicos (Jin Y-B et col., 2010), efectos sobre el metabolismo o el sistema endocrino (Karasek et col., 2004) y efectos sobre la población general o grupos en riesgo directamente relacionados con la exposición a campos electromagnéticos.

Las proteínas de estrés térmico (HSPs) se encuentran en todos los organismos vivos, desde las bacterias a los humanos (Morimoto R.I., 1993). Estas proteínas participan en procesos fisiológicos celulares de señalización hormonal, control del ciclo celular y proliferación y diferenciación celular (Morimoto R.I. et col., 1993; Helmbrecht K. et col., 2000). También ayudan en la regulación y control de los procesos de estrés ambiental celular (Gupta S.C. et col., 2010; Trautinger F. et col., 1996) relacionados con la etiopatogenia de varias enfermedades (Kalmar B. y Greensmith L., 2009). La preocupación respecto a los potenciales riesgos para los humanos expuestos a CEMs, han llevado a la elaboración de numerosos modelos experimentales para la detección en laboratorio de biomarcadores, que son sensibles a estos estímulos físicos. Se ha encontrado evidencia para los cambios en la expresión de HSPs en varios modelos de líneas celulares humanas (Lee S. et col., 2005, Caraglia M. et col., 2005; Alfieri R.R. et col., 2006) o en tejido de rata *in vivo* (Jorge-Mora T. et col., 2010) después de la exposición experimental a sistemas de radiofrecuencia. Otros estudios informan de que no hay cambios aparentes en estos marcadores biológicos después de la aplicación de otros modelos experimentales en laboratorio (Wang J. et col. 2006; Chauhan V. et col., 2006; Valbonesi P. et col., 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro del sistema endocrino, la glándula tiroides tiene una gran importancia debido a los diversos ajustes que realiza en su producción hormonal a través del sistema hipotálamo-hipofisario-tiroideo o su influencia en numerosas funciones del metabolismo y del crecimiento. Recientemente han aparecido numerosos estudios describiendo la relación entre la exposición a fuentes electromagnéticas a frecuencias extremadamente bajas (ELF) y radiofrecuencia (RF), y varias patologías de la glándula tiroidea como cáncer (Miliham et col., 2008), alteraciones en la producción de hormonas tiroideas (Rajkovic V. et col., 2003; Koyu et col, 2005; Eşmekaya, 2010) y otras disfunciones (Bergamaschi et col, 2004). Los niveles celulares de Hsp90 y Hsp70 en la glándula tiroides son conocidos por estar vinculados a la homeostasis (Wallin G. et col., 1992) y los niveles de citotoxicidad en ciertas patologías glandulares (Samadi A. et col., 2009; Paggi A. et col., 1995). Estas proteínas podrían ser biomarcadores para la detección de toxicidad o estrés ambiental que afecten al normal funcionamiento del tejido tiroideo. En este estudio, usamos los niveles de Hsp90 y Hsp70 para analizar el estrés celular inducido por radiación (Jarosz et col., 2010), si se afecta la actividad anti-apoptótica y la integridad (Joly et col., 2010) en el tejido tiroideo de rata expuesta a radiofrecuencia de 2,45 GHz en un sistema experimental GTEM.

Mediciones paralelas del estrés corporal, en los animales mediante sondas de temperatura rectal, nos permitieron determinar si existía alguna interacción entre los incrementos de temperatura de los animales y el estrés celular.

4.1.2. RESULTADOS.

4.1.2.1. Resultados de SAR.

En la tabla 15 se presentan los valores promedio y pico de SAR en el tiroides y cuerpo de las ratas, (promediado en 1 gr de las mismas partes del animal), para los distintos grupos estudiados, obtenidos desde las mediciones individuales de las ratas expuestas a diferentes potencias (P) y campos eléctricos (E).

Mediante el análisis estadístico utilizando un ANOVA de una vía, seguido de un test de Holm-Sidak se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre todos los valores de SAR medios, para las distintas potencias (1,5, 3 y 12 W) aplicadas a los subgrupos radiados y para el valor de SAR máximo pico en 1 gr de tiroides de rata o

cuerpo ($p < 0.001$, diferencias significativas $p < 0.05$). El incremento en los valores de SAR medio y máximo es directamente proporcional a la potencia inicial (P) y al valor del campo eléctrico (E) para cada subgrupo.

	MEDIDAS EXPERIMENTALES DE TASA DE ABSORCION ESPECÍFICA POR FDTD			
	Media de SAR en el Tiroides(W/kg)	Pico SAR en 1g Tiroides	MEDIA de SAR en el cuerpo(W/kg)	Pico SAR en 1g del cuerpo
P= 1,5W E=40,28V/m	$0,046 \pm 1 \cdot 10^{-3}$	$0,041 \pm 2 \cdot 10^{-3}$	$0,0169 \pm 7 \cdot 10^{-4}$	$0,089 \pm 9 \cdot 10^{-3}$
P= 3W E=40,28V/m	$0,104 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$0,076 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$0,0364 \pm 19 \cdot 10^{-3}$	$0,180 \pm 9 \cdot 10^{-3}$
P=12W E=80,56V/m	$0,482 \pm 12 \cdot 10^{-3}$	$0,340 \pm 10 \cdot 10^{-3}$	$0,161 \pm 4 \cdot 10^{-3}$	$0,795 \pm 2 \cdot 10^{-3}$

Tabla 15. Resultados experimentales de SAR en la glándula tiroides y en el cuerpo del animal calculados para los diferentes valores aplicados de potencia (P) y campo eléctrico (E).

4.1.2.2. Niveles de estrés y cambios en la temperatura rectal después de la exposición.

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, inmediatamente después de la exposición, a los 0, 30, 60 y 90 min y 24 h después de la radiación (cuando los animales fueron sacrificados). El seguimiento de la temperatura rectal, de los animales en cada grupo (radiados y no radiados), nos permitió determinar los cambios temporales en los niveles de estrés corporal, así como las diferencias en las respuestas entre los animales de experimentación.

El efecto de los diferentes niveles de potencia no dependió del tiempo de exposición. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre la potencia y el tiempo de exposición ($p = 0,886$). Las comparaciones del factor de potencia revelaron que no había diferencias significativas en la temperatura en todos los grupos (1,5, 3 y 12 W) con respecto al grupo control (0 W).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparaciones temporales, del tiempo de radiación, revelaron diferencias significativas en las temperaturas medias antes de la radiación y después de la radiación (0, 30, 60, 90 min; $p = 0,00038$, $p = 0,00020$, $p = 0,0029$, $p = 0,015$, respectivamente). No hubo diferencias significativas en las temperaturas medias después de la radiación ni a las 24 h ($p = 0,230$). Sólo se apreciaron diferencias significativas ($p = 0,003$) cuando el nivel de potencia fue máximo (12W) con respecto al grupo expuesto a los 0 min post-exposición.(Tabla 16).

POTENCIA	MEDIDAS EXPERIMENTALES DE LA TEMPERATURA RECTAL EN RELACIÓN A LA RADIACIÓN					
	TIEMPO					
	Antes	Minuto 0	30 minutos	60 minutos	90 minutos	24 horas
0W	$36,9 \pm 14 \cdot 10^{-2}$	$36,9 \pm 14 \cdot 10^{-2}$	$37,3 \pm 20 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 20 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 20 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 20 \cdot 10^{-2}$
1,5W	$37,0 \pm 4 \cdot 10^{-2}$	$37,5 \pm 18 \cdot 10^{-2}$	$37,4 \pm 13 \cdot 10^{-2}$	$37,2 \pm 26 \cdot 10^{-2}$	$37,3 \pm 10 \cdot 10^{-2}$	$37,0 \pm 14 \cdot 10^{-2}$
3W	$37,0 \pm 13 \cdot 10^{-2}$	$37,5 \pm 10 \cdot 10^{-2}$	$37,6 \pm 24 \cdot 10^{-2}$	$37,2 \pm 25 \cdot 10^{-2}$	$37,4 \pm 40 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 17 \cdot 10^{-2}$
12W	$36,8 \pm 19 \cdot 10^{-2}$	$37,7 \pm 12 \cdot 10^{-2}$	$37,5 \pm 11 \cdot 10^{-2}$	$37,5 \pm 11 \cdot 10^{-2}$	$37,4 \pm 15 \cdot 10^{-2}$	$37,2 \pm 1 \cdot 10^{-2}$

Tabla 16. Mediciones experimentales de temperaturas rectales.

* Indica diferencias significativas antes y después de la radiación.

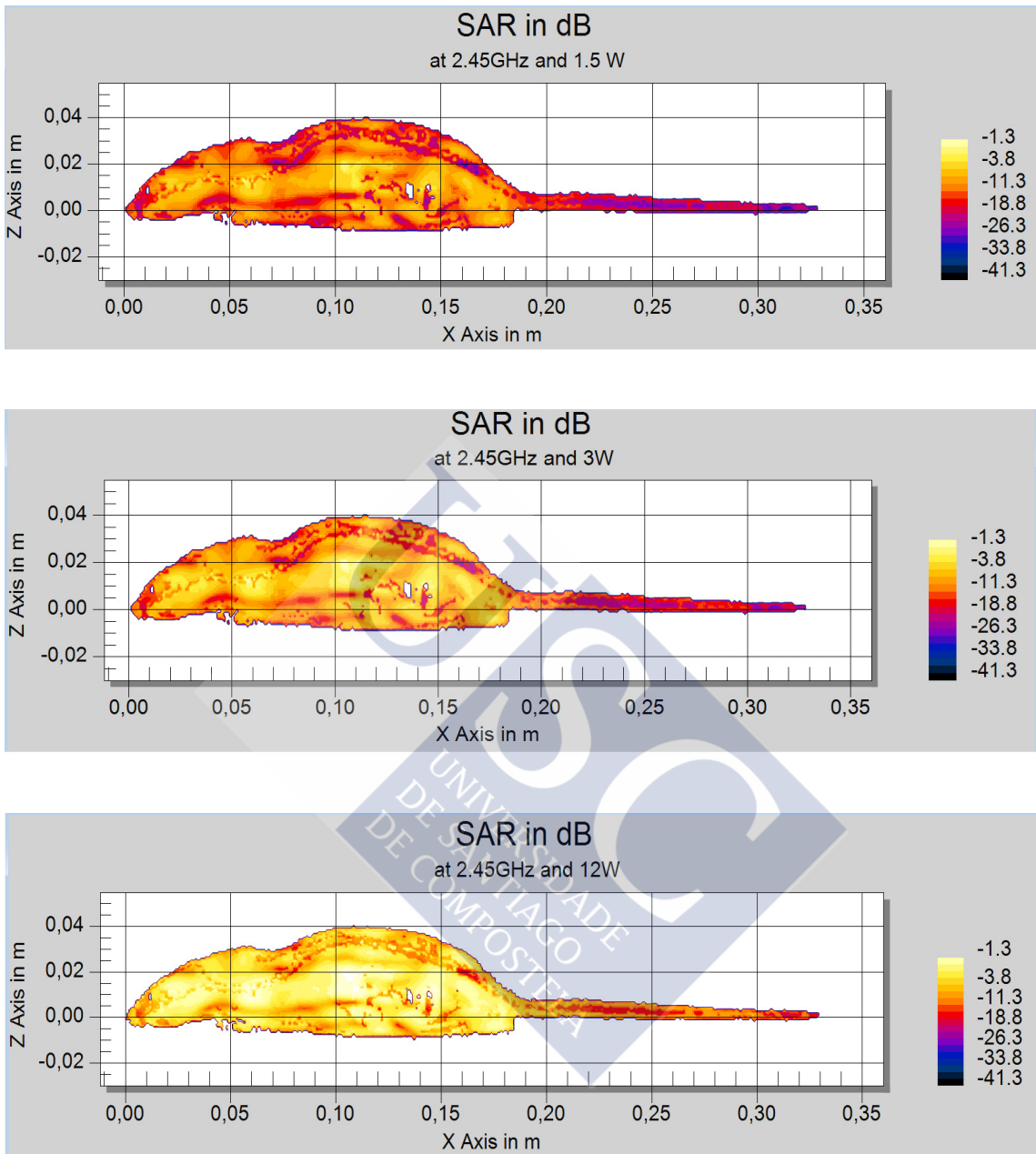


Figura 10. La distribución de SAR local en el fantomas de rata expuesto a (A) 1,5 W, (B) 3W y (C) 12W de 2,45 GHz, en el plano $X = 0,33$ m.

4.1.2.3. Resultados de los niveles de proteínas Hsp90 y Hsp70 determinados por ELISA.

4.1.2.3.1. Resultados de Hsp90.

Los dos factores considerados en el test ANOVA de dos vías fueron potencia (0, 1,5, 3 y 12 W) y el tiempo transcurrido entre la exposición y el sacrificio (90 min o 24 h). En la glándula tiroides, la diferencia de los valores para los diferentes niveles de potencia (0, 1,5, 3, 12 W) fueron estadísticamente significativos ($p < 0,001$), después de tener en cuenta los efectos de las diferencias de tiempo de 90 minutos o 24 horas después de radiación.

Las diferencias en los valores medios para los diferentes tiempos transcurridos después de la radiación no fueron estadísticamente significativos ($p = 0,127$), ni lo bastante grandes para excluir la posibilidad de que las diferencias fueran debidas a la variabilidad de un muestreo arbitrario, después de tener en cuenta los efectos de diferencias de potencia.

Se encontró que el efecto de los diferentes niveles de potencia dependía del tiempo transcurrido desde la radiación. Hubo una interacción estadísticamente significativa entre la potencia y el tiempo después de la radiación. ($p = 0,018$). Comparaciones múltiples llevadas a cabo en relación al factor de potencia, mostraron diferencias significativas respecto al subgrupo de control (potencia = 0) con 1,5 o 3W ($p = 0,00008$, $p = 0,0003$), no hubo diferencias significativas respecto a 12 W de potencia ($p = 0,0905$). (Fig. 11).

Grupo A (ratas sacrificadas y perfundidas 90 minutos después de la finalización de la radiación): La cantidad de Hsp90 expresada en la glándula tiroides, en ratas expuestas a la radiación de 1,5 y 3 W, fue significativamente diferente al de las ratas no radiadas (0 W) ($p < 0,0001$, $p < 0,022$, respectivamente). Los niveles de la proteína en las ratas radiadas a la máxima potencia (12W) no fueron significativamente diferentes de los del grupo no radiado ($p < 0,283$) (Fig. 11). Los niveles de proteína en las ratas del subgrupo radiado a mínima potencia (1,5 W) también mostraron diferencias significativas respecto a los subgrupos de ratas radiadas a la potencia de 3 o 12 W ($p < 0,009$, $p < 0,0001$).

Grupo B (ratas sacrificadas y perfundidas 24 horas después de la finalización de la radiación): La cantidad de Hsp90 expresada en la glándula tiroides, en ratas expuestas a la

radiación de 3 W, fue significativamente diferente de la de ratas no radiadas (0 W) ($p < 0,003$). Pero no hubo diferencias significativas en el nivel de Hsp90 expresado en ratas expuestas a la radiación en el grupo de 1,5 o 12 W en relación con las ratas no radiadas (0W).

4.1.2.3.2. Resultados de Hsp70.

Las diferencias en los valores medios para cada nivel de potencia, en la glándula tiroides, fueron estadísticamente significativas ($p = 0,037$), después de tener en cuenta los efectos de los diferentes tiempos después de la radiación. Las diferencias en los valores medios, para cada tiempo transcurrido después de la radiación, no fueron estadísticamente significativos ($p = 0,0924$). El efecto de los diferentes niveles de potencia, no dependió del tiempo transcurrido después de la radiación. No hubo significación estadística de la interacción entre potencia y tiempo después de la radiación ($p = 0,556$).

Las comparaciones del factor de potencia mostraron diferencias significativas entre el grupo control (potencia = 0 W) y los grupos que recibieron 1,5 o 3 W ($p = 0,0098$, $p = 0,0149$), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo expuesto a 12W de potencia ($p = 0,142$). (Fig. 11).

Grupo A (ratas sacrificadas y perfundidas 90 minutos después de la finalización de la radiación): La cantidad de Hsp70 expresada en el tiroides de ratas expuestas a la radiación a 1,5 W fue significativamente diferente al observado en las ratas no radiadas ($p = 0,010$). Sin embargo, el nivel de Hsp70 en el tiroides de ratas expuestas a radiación de 3 W y 12 W no fue significativamente diferente a los niveles observados en las ratas no radiadas ($p = 0,060$, $p = 0,156$). (Fig.11)

Grupo B (ratas sacrificadas y perfundidas 24 horas después de la finalización de la radiación): La expresión de Hsp70, en el tiroides de ratas expuestas a la radiación de 1,5, 3 y 12 W, no fueron significativamente diferentes a los niveles observados en las ratas no radiadas ($p = 0,065$, $p = 0,371$ y $p = 0,50$). (Fig. 11).

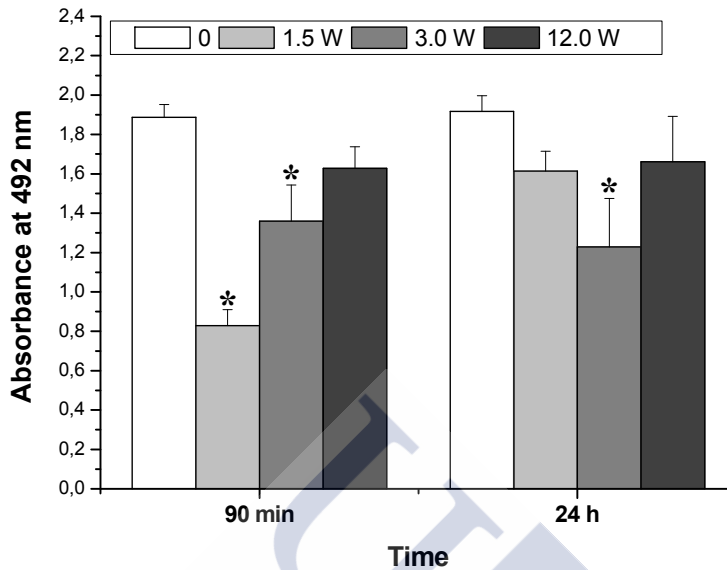
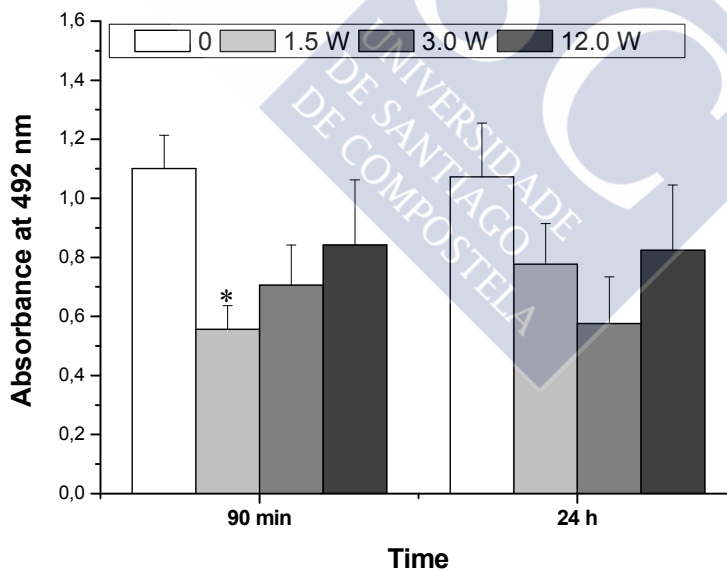
(A) PROTEINA HSP90 EN LA GLÁNDULA TIROIDES**(B) PROTEINA HSP70 EN LA GLÁNDULA TIROIDES**

Figura 11. Los histogramas representan los niveles de proteína Hsp90(A) y de proteína Hsp70 (B) detectados por ELISA en la glándula tiroides después de aplicar distintas potencias 0, 1,5, 3 y 12 W, transcurridos 90 minutos y 24 horas después de la exposición. Cada barra representa los valores medios \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) empleando un ANOVA de dos vías y un test a posteriori de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

4.1.2.4. Análisis con Hematoxilina y Eosina

A los 90 minutos y 24 horas después de la radiación, el examen de las secciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (H-E) bajo microscopía óptica con aumentos a 40X y 100X, no mostraron lesiones en la estructura del tejido tiroideo que pudiesen afectar a las células foliculares, tejido conectivo o coloide en los animales expuestos a 1,5 y 3 W, cuando se compararon con tejido tiroideo de animales no radiados (Fig.12 A-D). A los 90 minutos y 24 horas después de la exposición a radiación no ionizante a 2,45 GHz y potencia de 12 W, sólo se observó una ligera pérdida de cohesión celular en algunos folículos (Fig. 12 E, F).

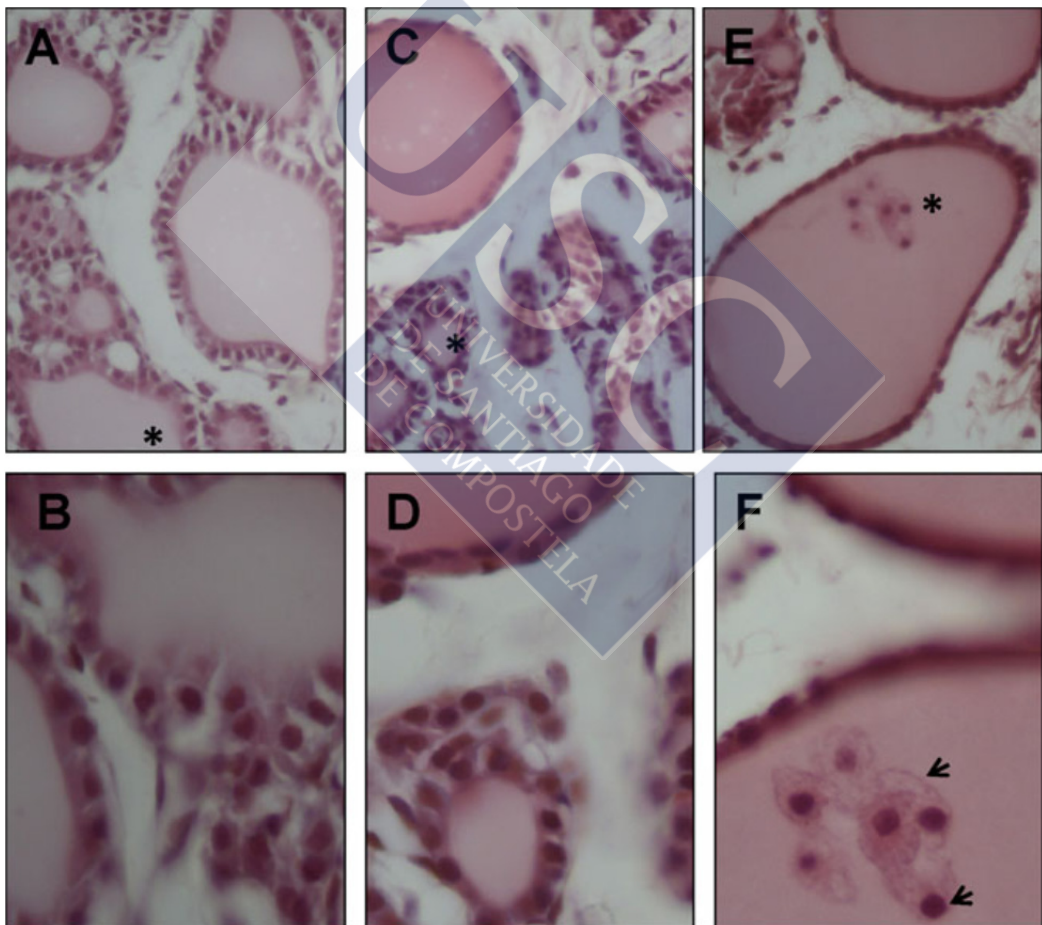


Figura 12. Las fotografías de tejido tiroideo de rata teñidos con Hematoxilina-Eosina (H-E) no muestran signos de daño celular en ratas expuestas a 1,5 W (A) y 3 W (C) y una ligera pérdida de cohesión en las células foliculares a 12 W (E) en aumento a 40X. Las fotos B, D y F muestran las áreas marcadas con * en aumento a 100X. Las flechas indican las células foliculares, las puntas de flecha indican tejido desestructurado.

4.1.2.5. Resultados de la Tinción con DAPI.

Se utilizó un microscopio de fluorescencia, en las muestras con tinción con DAPI, para examinar la morfología nuclear de las células que mostrasen signos de apoptosis. No se observaron cambios morfológicos, así como condensación de cromatina o fragmentación nuclear en secciones teñidas con DAPI en animales radiados (todos los grupos y SARs diferentes) y no radiados. (Fig. 13).

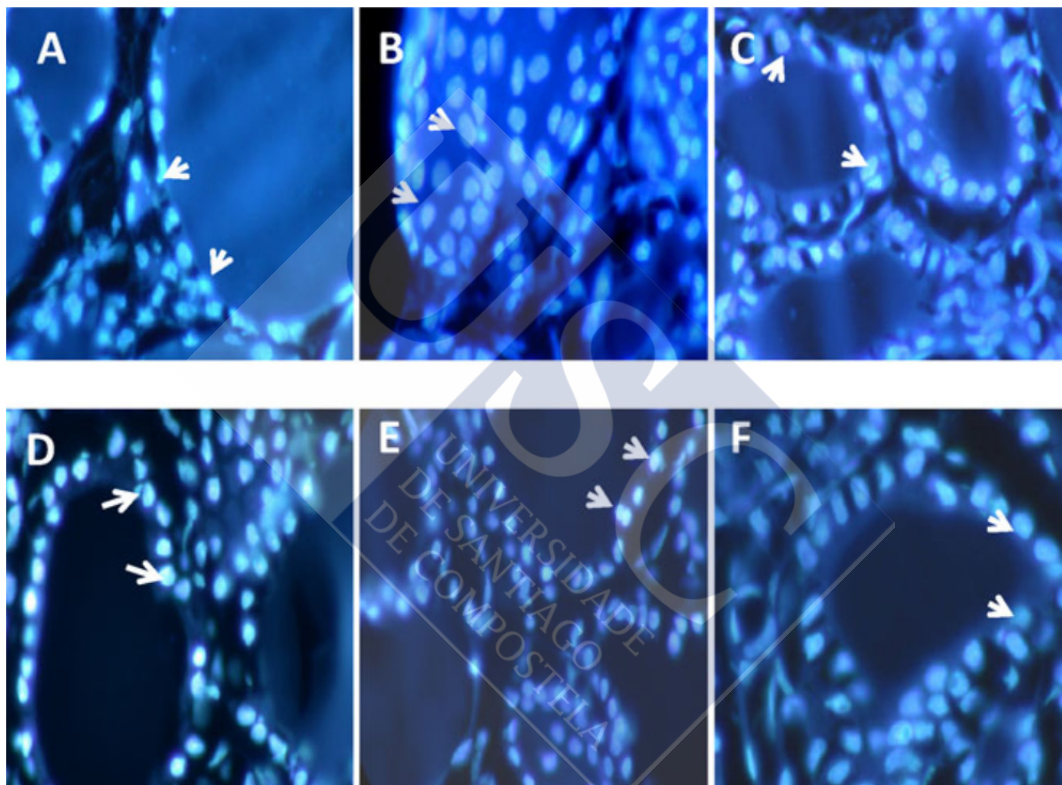


Figura 13. Las fotografías de tejido tiroideo de rata con tinción fluorescente con DAPI no muestran evidencias de fragmentación nuclear o condensación de la cromatina en las células epiteliales de los folículos tiroideos en cada uno de los grupos experimentales. Las fotos (A) (B) (C): animales sacrificados 24 horas después de la exposición a 0 W (control), 1,5 W o 12 W, respectivamente; (D) (E) (F): animales sacrificados 90 minutos después de la exposición 0 W (control), 1,5 W o 12 W. Las flechas indican células foliculares sin signos de apoptosis en aumento a 100 X.

4.1.3. DISCUSIÓN.

No conocemos estudios previos que determinen los niveles de estrés de las células de la glándula tiroides cuantificando los índices de proteínas de estrés térmico (HSP), en animales expuestos in vivo a la acción de una fuente electromagnética. La glándula tiroides regula funciones inmunitarias y en diversas hormonas. Así, la posibilidad de provocar modificaciones en la maquinaria de las chaperonas celulares de la glándula, a través de la interacción con la radiación no ionizante, constituye un hecho relevante. Nuestros resultados indicaron modificaciones importantes en los niveles de proteína Hsp90 y Hsp70, tras la exposición a campos electromagnéticos a 2,45 GHz. Con un importante descenso 90 minutos después de la exposición, en relación a los controles, para Hsp90 y Hsp70 cuando se aplicó el SAR mínimo ($0,046 \pm 1 \cdot 10^{-3}$ y/o $0,104 \pm 5 \cdot 10^{-3}$). Así mismo, los niveles de radiación a los que el tejido tiroideo se mostró más resistente en su recuperación fue para potencias de 3 W, ya que 24 horas después de la radiación no se alcanzaron todavía los niveles basales de proteína que tienen los animales control o no expuestos a la radiación.

El uso de la frecuencias a 2,45 GHz en este experimento, comúnmente empleada en telecomunicaciones o a nivel terapéutico, vino determinada por los efectos biológicos previos descritos por otros autores (Malyapa R.S. et col., 1998; Paulraj R. et col., 2006) y nuestros estudios previos de Hsp90 en distintas regiones del cerebro (Jorge-Mora.T. et col., 2010). También a esta misma frecuencia, a niveles subtérmicos, en modelos in vitro y en células humanas, se han encontrado cambios significativos en la expresión de Hsp90 y no para Hsp70 (Lee S. et col., 2005; Wang J. et col., 2006; Alfieri R.R. et col., 2006; Pérez F.P. et col., 2008). Sin embargo, otros autores comunican estudios de cambios en Hsp70 aplicando potencias muy elevadas de 20 W/kg, que alcanzan niveles térmicos (Tian F. et col., 2002). Los resultados que se describen en este experimento, indicaron que niveles de SAR bajos (SAR máximo en el cuerpo $0,089 \pm 9 \cdot 10^{-3}$ ó $0,180 \pm 9 \cdot 10^{-3}$ y en el tiroides, $0,041 \pm 2 \cdot 10^{-3}$ y $0,076 \pm 4 \cdot 10^{-3}$) provocaron descensos en los niveles de proteínas de estrés térmico de las células tiroideas.

Existe una gran variedad de estímulos ambientales que pueden causar estrés celular y modificar la síntesis de Hsp90 y/o Hsp70 en los tejidos de los mamíferos, jugando un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular (Morimoto R.I. et col., 1993; Kregel K.C. et col., 2002) y en los procesos antiapoptóticos y de

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

diferenciación celular (Schmitt, et col.2007; Lanneau D. et col., 2007; Gupta S.C. et col., 2010), en el estrés oxidativo (Kalmar B. y Greensmith L., 2009) y la radiación ultravioleta (Trautinger et col., 1996) o la radiación ionizante (Calini V. et col., 2003; Kang C.-M. et col., 2002).

Aunque algunos autores describen también esta respuesta al estrés celular, se esperaría encontrar más un ascenso en la expresión de HSP que un descenso. Así, de Pomerai y colaboradores, por ejemplo, rectificaron su estudio y aunque en principio lo achacaron a efectos no térmicos (de Pomerai D. et col., 2000), finalmente concluyeron que eran debidos a efectos térmicos, (de Pomerai D. et col., 2006).

Nuestra experiencia, que ha sido corroborada por otros estudios, sugieren que la interacción de RF en los tejidos podría activar simultáneamente mecanismos térmicos y no térmicos (Jorge-Mora T. et col., 2010; Jorge-Mora T., 2011; López-Martín E. et col., 2006; López-Martín E. et col., 2009; Curcio G. et col., 2005). En algunos casos un mecanismo es más aparente que el otro; en este experimento, la temperatura rectal fue ligeramente mayor en animales con un SAR mayor. Sin embargo, esto no provoca un incremento significativo en la expresión de Hsp90 y Hsp70, el cual es probablemente compensado por los mecanismos termorreguladores de los animales (Tabla 16).

El descenso de las proteínas de estrés térmico parece indicar la existencia de estímulos físicos no térmicos, que actúan con mecanismos no identificados a través de campos eléctricos de baja intensidad, sin relación directa entre la potencia y la magnitud del efecto. Porque en los animales que recibieron radiación no ionizante de cuerpo entero, a través de la piel, el sistema está sujeto a múltiples estímulos físicos con repercusiones biológicas que son difíciles de identificar con precisión. El estrés tisular puede estar añadido a otros mecanismos con la actuación simultánea de circuitos funcionales diferentes (Jorge-Mora T. et col., 2011).

La literatura también describe descensos en las Hsp90 y Hsp70 doce horas después a un estado de anoxia (Ramaglia V. y Buck L.T., 2004) y durante la isquemia cerebral (Yang S.H. et col., 2005). Estos datos indican que el incremento en la expresión de HSP no es crítica en la adaptación temprana. Sin embargo, la regulación al final implica el incremento de las proteínas de estrés térmico, lo que sugiere que las proteínas del estrés juegan un papel promoviendo la tolerancia a largo plazo.

La Hsp90 en la glándula tiroidea, cuyos niveles descendieron en este experimento después de la radiación, se expresa constitutivamente a niveles mucho más

altos de los que requieren sus funciones celulares normales. En un ambiente de estrés, esta proteína puede desestabilizarse y alterar la relación entre genotipo y fenotipo (Jarosz D.F. y Lindquist. S, 2010). Así, en la glándula tiroides, la expresión de Hsp90 varía significativamente, en tejido normal los niveles de proteína son mucho más altos que en la glándula hiperplásica o en el cáncer papilar de tiroides. (Wallin G. et col., 1992). Varios autores relacionan esto con la diferenciación celular, proceso fisiológico que se encuentra alterado. En algunos casos, los niveles de ésta u otras proteínas de estrés térmico, en la glándula tiroidea, pueden ser un indicio de la función tiroidea normal (Ginsberg J. et col., 2006) o patológica (Medeiros-Neto G. et col., 1996; Boltze C. et col., 2003; Baryshev M. et col, 2004). Incluso existe una relación importante entre la actividad de la Hsp90 y el grado de estimulación hipofisaria de las células tiroideas (Ginsberg J. et col., 2006).

Los niveles de la proteína Hsp70, después de exponer la glándula tiroides del roedor a la radiación, se encontraron también descendidos, presentando una recuperación rápida, hecho probablemente relacionado con el efecto reparador o citoprotector de la proteína (Rajdev S. y Sharp F.R., 2000). En cualquier caso los niveles de las proteínas Hsp90 y Hsp70 acompañan a las células tiroideas, sean normales o patológicas. Así, los modelos experimentales de células tiroideas humanas, constituyen un modelo óptimo para el estudio de la respuesta en la expresión de proteínas de estrés Hsp90 y Hsp70 en enfermedades autoinmunes de la glándula tiroides, ante estímulos térmicos y químicos (Youde S.J., 1998). A pesar de que diversas patologías tiroideas se acompañan de incrementos de las proteínas Hsp90 y Hsp70 (Medeiros-Neto G. et col., 1996; Boltze C. et col., 2003; Baryshev M. et col, 2004), también encontramos que situaciones como hipertermia, envejecimiento o enfermedad pueden disminuir la respuesta de las HSPs (Gutsmann-Conrad A. et col., 1998; Pardue S. et col., 2007) en diversos tejidos. Esto nos hace pensar que el incremento en la síntesis de las HSPs puede ser necesario en alguna respuesta celular, pero no en todas (Carper S.W. et col., 1987). El descenso de los niveles de las chaperonas puede indicar que la magnitud de la respuesta, de las HSPs de diferentes tipos celulares, puede afectar a su subsistencia después del estrés (Pardue S. et col., 2007). Así, en distintos estudios animales en tejidos del sistema nervioso, se ha observado gran diversidad y vulnerabilidad a la respuesta al estrés en la inducción de las HSPs (Jorge-Mora T. et col., 2010; Gutsmann-Conrad A. et col., 1998).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles similares observados para Hsp90 y Hsp70, indican un mecanismo común de funcionamiento no discriminatorio, como fue observado en algunos casos de estimulación terapéutica y planificada de Factor de estrés térmico 1 (HSF-1) (Powers y Workman, 2007). Este factor induce el incremento de ambas chaperonas Hsp90 y Hsp70 (Kieran D et col., 2004). ¿Es posible que la radiación desde un mecanismo no térmico pueda inhibir los efectos de la HSF 1 en algunos órganos y tejidos? Esta hipótesis requerirá una investigación futura. Sin embargo, las dos chaperonas tienen funciones diferentes en los mamíferos, las cuales se manifiestan en sus diferentes respuestas al mismo estímulo físico (Parcellier A. et col., 2003; Lanneau D. et col., 2007). De este modo, la Hsp90 de las células tiroideas son más sensibles a los 3 W de potencia. Esto también aparece en exposiciones repetidas de tejido nervioso (Jorge-Mora T. et col., 2011), pero éste no es el caso con la Hsp70.

Por otro lado, a pesar del descenso en la inducción de la respuesta de los niveles de las proteínas de estrés, no encontramos indicios de lesiones ni de apoptosis, contrariamente a otros autores que asocian niveles altos de Hsp90 y Hsp70 con un incremento de la función citoprotectora y antiapoptótica de estas chaperonas (Pardue S. et col., 2007; Trautinger F. et col., 1996). Así, en la exposición a campos electromagnéticos a 900 MHz, se ha descrito que provoca cambios patológicos en la glándula tiroidea, que se relacionan con alteraciones en la estructura glandular, asociadas a un incremento de la vía caspasa-dependiente de la apoptosis (Eşmekaya M.A. et col., 2010).

Aunque, en diversos estudios, no se ha establecido una relación causal entre campos electromagnéticos y cáncer de tiroides (Lope V. et col., 2006; Kang K.I. et col., 1998), en numerosas investigaciones se han descrito los efectos funcionales e histológicos, causados por campos electromagnéticos en la glándula tiroidea. Así, la exposición a LF-EMF o RF a 900 MHz provoca cambios en la secreción hormonal de T3 y T4 (Rajkovic V. et col., 2003; Koyu A. et col., 2005; Bergamaschi A. et col., 2004) y alteraciones morfológicas que afectan al epitelio, tejido conectivo, células foliculares e interfoliculares y mastocitos (Rajkovic V. et col., 2003; Rajkovic V. et col., 2005; Rajkovic V. et col., 2006). Estos cambios provocados en la glándula tiroidea, después de la exposición a fuentes de radiación no ionizante, se pueden recuperar morfológicamente pero no desde un punto de vista funcional (Rajkovic V. et col., 2003).

Hay evidencias que apoyan la hipótesis de que los estrógenos tienen una relación directa con las células foliculares e influye en el crecimiento y función tiroidea, en

condiciones tanto normales como anormales (Santin y Furlanetto, 2011). Sin embargo, no hay indicaciones de que la RF pueda interferir con la actividad estrogénica de ratas hembra (Yamashita H.et col., 2010) provocando un efecto indirecto sobre la función tiroidea.

Esto nos hace reflexionar sobre los resultados de nuestro trabajo, la falta de alteraciones visibles, sin signos de apoptosis en la estructura glandular, podría deberse a que la exposición a la radiación no ionizante fue muy limitada en el tiempo.





4.2. EXPERIMENTO 2

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



4.2.1. INTRODUCCIÓN.

La termoterapia profunda o diatermia constituye una aplicación médico-terapéutica que se basa en la utilización de microondas como fuente de radiación electromagnética para el tratamiento o rehabilitación de múltiples procesos crónicos principalmente musculoesqueléticos o reumatológicos. La radiación de microondas interacciona con el cuerpo y aunque los efectos beneficiosos provocados por el incremento de temperatura son conocidos, muchos de los efectos de la exposición a la radiación, de naturaleza no térmica, todavía están por precisar.

La exposición de la región del cuerpo humano a tratar con microondas implica que áreas próximas también reciban parte de esta radiación no ionizante. La glándula tiroides es uno de los órganos vitales más expuestos y que podría ser más vulnerable a la exposición a campos electromagnéticos (CEM) (Sinha R.K., 2008). La exposición crónica a microondas con radiofrecuencia a 2,45 GHz 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 (Sinha R.K., 2008). 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 (Mortavazi S. et col., 2009; Koyu A. et col., 2005).

Recientemente, hemos encontrado que la radiación aguda subtérmica a 2,45 GHz puede alterar los niveles de estrés celular en el hipotálamo (Jorge-Mora et col., 2011) y en la glándula tiroides de la rata, sin alterar inicialmente la capacidad apoptótica (Misa-Agustiño M.J. et col., 2012). Sorprendentemente, hay muy pocos trabajos que describan los cambios que tienen lugar en la morfología de la glándula tiroides, después de la exposición cercana a la radiación no ionizante a 2,45 GHz.

En este estudio analizamos, en un modelo experimental de diatermia en ratas, las modificaciones que tienen lugar en la morfología de la glándula tiroides, mediante test inmunohistoquímico de la proteína de estrés Hsp90, 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 Gigahertz Transverse Electromagnetic (GTEM).

4.2.2. RESULTADOS.

4.2.2.1. Tasa de absorción específica (SAR).

La energía media absorbida por las ratas en los 3 grupos fue estimada por la ecuación: $SAR_E = SAR_S \times W_S/W_E$, junto con el peso medio, SAR medio \pm EEM en tiroides y cuerpo, y SAR máximo \pm EEM promediado para 1 gr de tiroides y de cuerpo, a una frecuencia de 2,45 GHz en una cámara Shaffner GTEM.

El análisis estadístico de los resultados de SAR de los animales se realizó mediante un ANOVA de una vía para los diferentes niveles de radiación y SAR medio en tiroides o cuerpo y SAR máximo promediado para 1 gr de tiroides o tejido corporal, reveló diferencias significativas en todos los valores de SAR ($P = <0,001$). La tabla 17 muestra los valores promedio del SAR en el tiroides y en el cuerpo de la rata así como los valores de SAR máximo para 1 gr de tiroides y cuerpo, obtenidos de las mediciones individuales de ratas expuestas a diferentes potencias (P) y campos eléctricos (E). El incremento en los valores de SAR promedio y máximo fue directamente proporcional a la potencia inicial (P) y al valor del campo eléctrico (E) para cada subgrupo.

	Media de SAR en Tiroides (W/kg)	Pico SAR en 1g de Tiroides	Media de SAR en cuerpo (W/kg)	Pico SAR en 1g de cuerpo
EXPOSICIÓN AGUDA				
P:3W E:40,28V/m	0,102 \pm 12 \cdot 10 ⁻³	0,076 \pm 4 \cdot 10 ^{-3(2*)}	0,0364 \pm 19 \cdot 10 ^{-3(2*)}	0,180 \pm 9 \cdot 10 ^{-3(2*)}
P:12W E:80,56V/m	0,429 \pm 12 \cdot 10 ^{-3(1,3*)}	0,340 \pm 10 \cdot 10 ^{-3(1,3*)}	0,161 \pm 4 \cdot 10 ^{-3(1,3*)}	0,795 \pm 2 \cdot 10 ^{-3(1,3*)}
EXPOSICIÓN REPETIDA				
P:3W E: 40,28V/m	0,107 \pm 6 \cdot 10 ^{-3(2*)}	0,0809 \pm 14 \cdot 10 ^{-4(2*)}	0,0382 \pm 7 \cdot 10 ^{-3(2*)}	0,189 \pm 3 \cdot 10 ^{-3(2*)}

Tabla 17. 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 fueron comparados mediante un ANOVA de una vía para las diferencias entre potencia (P) o campo eléctrico (E) y comparaciones a posteriori con el test de Dunn. Para comparaciones múltiples, las diferencias fueron consideradas significativas con $p < 0,05$.

Los * indican diferencias significativas entre (P=3)¹, (P=12)² y repetidas (P=3)³.

4.2.2.2. Estudio de morfología de la glándula tiroides.

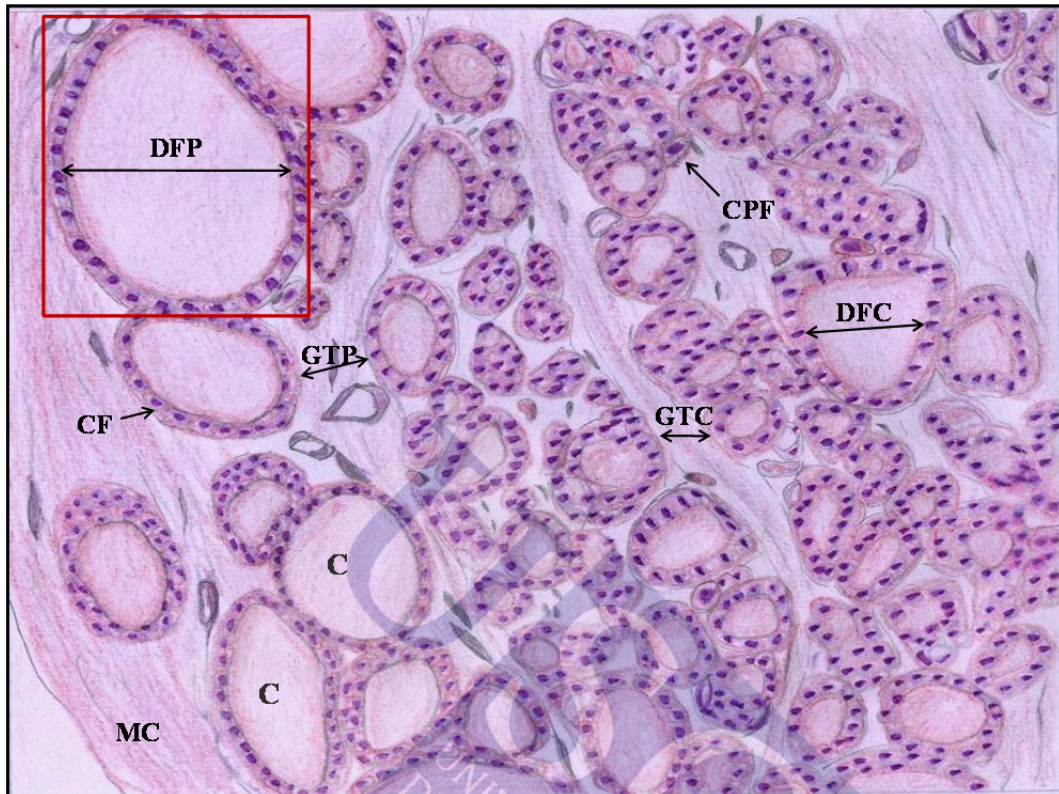


Figura 14. El dibujo muestra la representación de una preparación histológica con la técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E,) en la glándula tiroides de rata. Están señaladas las áreas anatómicas medidas en las glándulas de ratas en todos los grupos estudiados, con exposición aguda (grupos A y B) y repetida (grupo C) y los controles correspondientes: folículo (recuadro rojo), diámetro del folículo central (DFC), diámetro del folículo periférico (DFP) grosor del tabique central (GTC) y grosor del tabique periférico (GTP). Además se identifican, la membrana capsular (MC), coloide(C), célula folicular (CF) y célula parafolicular (CPF).

4.2.2.3. Resultados de los parámetros morfológicos medidos en la glándula tiroides.

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 W), respecto a los animales no radiados. El grosor de los tabiques mostró modificaciones transitorias a nivel periférico y no se presentaron diferencias a nivel central, en los animales radiados. Los resultados de los análisis de los test estadísticos son los siguientes:

Los valores obtenidos de la medición de los diámetros de folículos centrales indicaron que la radiación ($p < 0,001$) es un factor significativo en sí mismo, pero no los otros dos factores considerados, tiempo postexposición (90 min/ 24 h) o la potencia empleada (3 o 12 W), cuando se analizaron los datos mediante un ANOVA de tres vías. El efecto de la radiación depende del tiempo de postexposición ($p < 0,001$), pero no depende del nivel de la potencia que esté presente ($p = 0,982$). Tampoco el efecto de la potencia depende del tiempo de post-exposición que esté presente ($p = 0,355$). (Ver la tabla 18).

Noventa minutos después de la exposición a la radiación con potencias de 3 o 12 W, el diámetro de los folículos centrales del tiroides tenía un tamaño significativamente mayor que los animales no radiados ($p < 0,001$ en ambos casos). Veinticuatro horas después de la radiación a 3 W o 12 W, los diámetros de los folículos centrales, no presentaron diferencias significativas en su diámetro con los animales control ($p = 0,181$, $p = 0,375$; respectivamente). (Ver las tablas 22 y 23).

El análisis de los resultados de la medición de los diámetros de los folículos periféricos indicaron que tanto la radiación como la potencia son factores estadísticamente significativos ($p \leq 0,001$ y $p = 0,014$ respectivamente). El efecto de la radiación depende de la potencia ($p = 0,014$), pero no del tiempo postexposición ($p = 0,887$) (Ver la tabla 19). Los folículos periféricos presentaron un tamaño mayor en los animales radiados respecto a los no radiados, noventa minutos después de la radiación, independientemente de la potencia aplicada, 3 o 12 W ($p = 0,003$ y $p = 0,024$,

repectivamente). Hay un incremento significativo del diámetro de los folículos periféricos en relación a los animales no radiados, veinticuatro horas después de la radiación, solo cuando se aplica el SAR más elevado, ($p < 0,001$) (Ver las tablas 22 y 23).

El análisis estadístico de los resultados del grosor en los tabiques de tejido conectivo próximo a los folículos centrales determinaron, mediante el ANOVA de tres vías que cualquiera de los factores considerados por separado, radiación, potencia y tiempo postexposición ($p = 0,089$; $p = 0,392$; $p = 0,482$) o las interacciones entre ellos no son significativas (Ver tabla 20). Tampoco se mostraron diferencias estadísticamente significativas noventa minutos después de la radiación al comparar el grosor de los tabiques centrales entre animales radiados y no radiados, expuestos con ambas potencias ($p = 0,765$ y $p = 0,93$). Veinticuatro horas después de la radiación aparece un incremento significativo en el grosor de los tabiques centrales solo en los animales sometidos a potencia de 12 W ($p = 0,010$). (Ver tablas 22 y 23).

La comparación de los valores promedio obtenidos para el grosor de los tabiques periféricos reflejaron diferencias significativas para los distintos niveles de radiación ($p < 0,001$,) con un efecto significativo que aparece por la interacción entre la radiación x tiempo postradiación ($p < 0,022$). Sin embargo, ni los distintos niveles de potencia o el tiempo después de la radiación fueron factores que mostrasen efectos significativos en el grosor de los tabiques periféricos. Tampoco la interacción de los tres factores, radiación x potencia x tiempo postradiación, o las interacciones dos a dos (Ver tabla 21). Noventa minutos después de la exposición a ambas potencias (3 y 12 W), se apreció una disminución del grosor de los tabiques periféricos, estadísticamente significativa con respecto a los animales no radiados ($p = 0,004$ y $p = 0,031$, respectivamente). Los animales radiados con ambos niveles de SAR mostraron recuperación en el grosor de los tabiques periféricos veinticuatro horas después de la exposición, no siendo significativo el efecto entre animales radiados y no radiados ($p = 0,219$; $p = 0,291$, respectivamente). (Ver tablas 22 y 23).

Animales del Grupo C en relación al grupo A expuestos a 3 W de potencia.

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

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 (Ver figuras 15 y 16). Los resultados de los análisis estadísticos, con un ANOVA de dos vías, teniendo en cuenta los factores Radiación x Número de exposiciones, son los siguientes:

La radiación incrementa el diámetro de los folículos centrales cuando la exposición es única y aguda, pero no en el caso de que la exposición sea repetida, ya que el diámetro de los folículos centrales aparece significativamente superior cuando se somete el tiroides a una sola exposición ($p < 0,001$). De manera que cuando los animales se someten a exposiciones repetidas, no hay diferencias significativas entre los animales radiados y no radiados ($p = 0,984$). (Fig. 15 A).

El efecto de la radiación aparece de forma evidente en los folículos periféricos incrementando su tamaño, tanto en los animales sometidos a exposiciones repetidas como con una única exposición aguda, si se comparan a los animales no radiados ($p = 0,008$ y $p = 0,043$, respectivamente). El efecto de la radiación en los folículos periféricos, tiene una mayor intensidad cuando la exposición es única y aguda que cuando la exposición es repetida ($p < 0,001$). (Fig 15 B).

En el grosor de los tabiques de tejido conectivo situados a nivel central no hay un efecto apreciable de la radiación tanto en exposiciones repetidas como en exposición aguda, ya que no se mostraron diferencias significativas en cualquiera de los dos casos, entre animales radiados y no radiados ($p = 0,151$).

En los tabiques periféricos de las glándulas tiroides de los animales, el efecto de la radiación no es evidente en las exposiciones repetidas ($p = 0,854$) al contrario que en las exposiciones agudas, donde el tamaño del grosor del tabique es inferior al de animales no radiados ($p = 0,005$).

Efectos	F	DF	P-valor
Radiación	49,04	1	< 0,001
Potencia	0,0004	1	0,982
Tiempo postrad	0,149	1	0,700
Rad x P	0,0004	1	0,982
Rad x T	11,92	1	< 0,001
P x T	0,861	1	0,355
Rad x P x T	0,861	1	0,355

Tabla 18. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para diámetro de folículo central en tiroides. Radiación (Rad), Potencia (P), Tiempo postradiación (T)

Efectos	F	DF	P-valor
Rad	30,383	1	< 0,001
P	6,219	1	0,014
T	0,00290	1	0,957
Rad x P	6,219	1	0,014
Rad x T	0,0204	1	0,887
P x T	6,022	1	0,015
Rad x P x T	6,022	1	0,015

Tabla 19. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para diámetro de folículo periférico en tiroides.

Efectos	F	DF	P-valor
Rad	2,926	1	0,089
P	0,737	1	0,392
T	0,496	1	0,482
Rad x P	0,718	1	0,398
Rad x T	2,306	1	0,131
P x T	1,455	1	0,230
Rad x P x T	1,482	1	0,225

Tabla 20. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para grosor de tabique central en tiroides.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectos	F	DF	P-valor
Rad	24,262	1	< 0,001
P	1,398	1	0,239
T	2,431	1	0,121
Rad x P	1,009	1	0,317
Rad x T	5,394	1	0,022
P x T	0,569	1	0,452
Rad x P x T	0,869	1	0,353

Tabla 21. Resultados de ANOVA de 3 vías (incluyendo Radiación X Potencia X Tiempo postradiación) para Grosor de tabique periférico en tiroides.

		90 min postexposición			24 h postexposición		
		NO RAD	RAD		NO RAD	RAD	
Parámetros (µm)	N			P valor			P valor
DFC	28	53 ± 4	83 ± 3	<0,0010	63 ± 4	70 ± 3	0.181
DFP	28	105 ± 6	130 ± 5	0,003	104 ± 6	110 ± 6	0.462
GTC	28	22 ± 2	23 ± 2	0,765	21 ± 2	22 ± 2	0.542
GTP	28	39 ± 5	18 ± 4	0,004	32 ± 5	23 ± 5	0.219

Tabla 22. Valores medios ± EEM en µm de los parámetros en la glándula tiroides: diámetro de folículos centrales (DFC), diámetro de folículos periféricos (DFP), grosor de tabique central (GTC) y grosor de tabique periférico (GTP) 90 minutos (90 min) y 24 horas (24 h) postexposición en animales no radiados (NO RAD) y radiados (RAD) a radiofrecuencia de 2,45 GHz y 3 W de potencia. ($p < 0,05$, ANOVA de 2 vías seguido de test de Tukey).

		90 min postexposición			24 h postexposición		
		NO RAD	RAD		NO RAD	RAD	
Parámetros (µm)	N			P valor			P valor
DFC	30	53 ± 4	78 ± 4	<0,001	63 ± 4	75 ± 4	0,375
DFP	30	105 ± 7	130 ± 7	0,024	104 ± 7	159 ± 7	<0,001
GTC	30	22 ± 2	22 ± 2	0,93	21 ± 2	28 ± 2	0,010
GTP	30	39 ± 6	13 ± 6	0,003	32 ± 5	22 ± 5	0,291

Tabla 23. Valores medios ± EEM en µm de los parámetros en la glándula tiroides: diámetro de folículos centrales (DFC), diámetro de folículos periféricos (DFP), grosor de tabique central (GTC) y grosor de tabique periférico (GTP) 90 minutos (90 min) y 24 horas (24 h) postexposición en animales no radiados (NO RAD) y radiados (RAD) a radiofrecuencia de 2,45 GHz y 12 W de potencia. ($p < 0,05$, ANOVA de 2 vías seguido de test de Tukey).

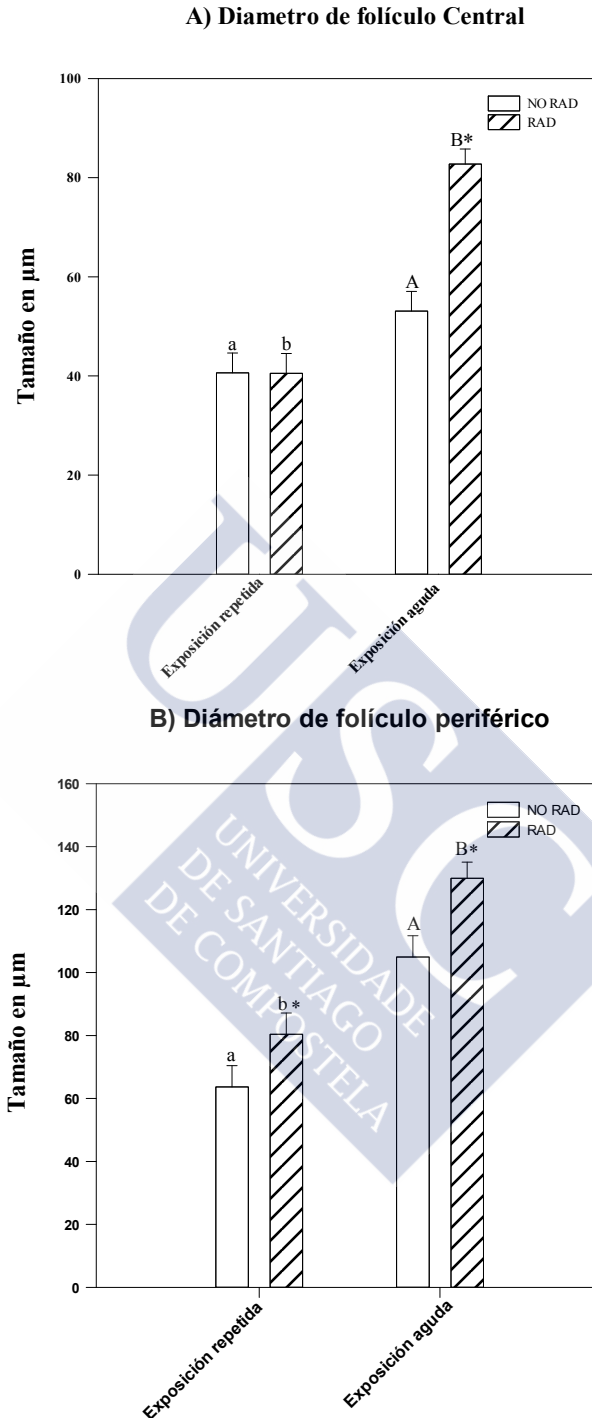


Figura 15. Los histogramas representan en μm (A) el diámetro de los folículos centrales (DFC) y (B) el diámetro de los folículos periféricos (DFP) en ratas no radiadas (NO RAD) y ratas radiadas (RAD) del grupo C con exposiciones repetidas y grupo A con exposiciones agudas. Cada barra representa el valor medio \pm EEM. Los * indican las diferencias estadísticas entre radiados/no radiados y las letras **a**, **b** indican las diferencias estadísticas entre exposiciones repetidas y exposiciones agudas ($p < 0,05$), ANOVA de dos vías y posteriormente test de Tukey.

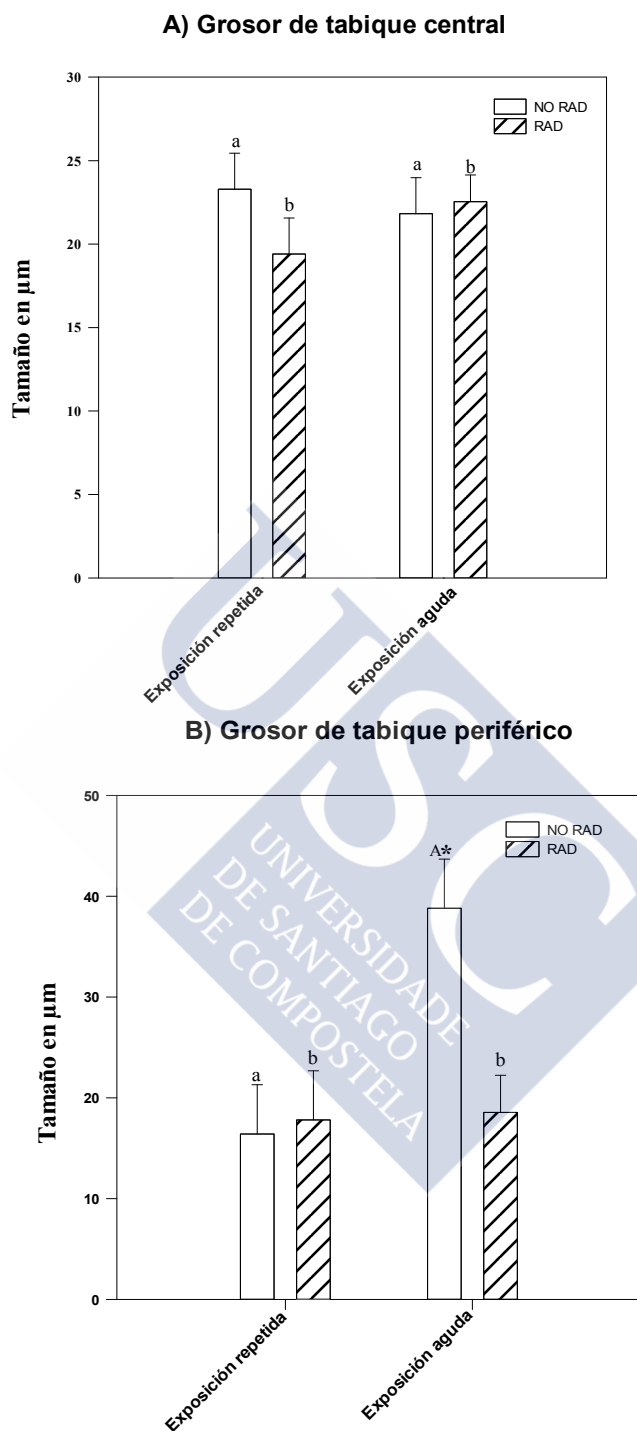


Figura 16. Los histogramas representan en μm (A) el grosor de tabique central (GTC) y (B) el grosor del tabique periférico (GTP) en ratas no radiadas (NO RAD) y ratas radiadas (RAD) del grupo C con exposiciones repetidas y grupo A con exposiciones agudas. Cada barra representa el valor medio \pm EE. El * indica las diferencias estadísticas entre radiados/no radiados y las letras a, b indican las diferencias estadísticas entre exposiciones repetidas y exposiciones agudas. ($p < 0,05$, ANOVA de dos vías y posteriormente test de Tukey).

4.2.2.4. Distribución del marcaje inmunohistoquímico de la proteína Hsp90 en la glándula tiroides.

Se estudió la distribución en la expresión de Hsp90 en las siguientes estructuras glandulares del tiroides, en el tejido conectivo de la membrana capsular e interlobulillar y en las células foliculares y células parafoliculares.

En la glándula tiroides expuesta a la radiación de campos electromagnéticos a 2,45 GHz de forma aguda, la distribución de expresión de Hsp90 se modifica según la potencia aplicada:

- La expresión de Hsp90 en los animales sometidos a exposiciones agudas, aparece más intensa en el tejido conectivo capsular e interlobulillar 90 min después de la radiación (grupo A) con SAR de $0,102 \pm 12 \cdot 10^{-3}$, sin embargo este marcaje parece disminuir al utilizar SAR de $0,429 \pm 12 \cdot 10^{-3}$. Veinticuatro horas después, aparece (grupo B) una expresión muy baja para cualquiera de las dos potencias. (Ver figura 17). En las exposiciones repetidas (grupo C) a la radiación con microondas se observó un descenso en la expresión de Hsp90, tanto a nivel del tejido conectivo de la membrana capsular como interlobulillar. (Ver figura 18).
- Noventa minutos después de la radiación (grupo A) las células foliculares y parafoliculares expresan un marcaje inmunopositivo para la proteína Hsp90 cuando los animales se exponen a SAR de $0,102 \pm 12 \cdot 10^{-3}$, sin embargo hay una pobre expresión de esta proteína de estrés térmico cuando se exponen los animales a SAR de $0,429 \pm 12 \cdot 10^{-3}$. La expresión de la proteína Hsp90 en las células foliculares y parafoliculares es muy baja 24 horas después de la radiación aguda (grupo B), para ambos niveles de SAR, y prácticamente no hay expresión cuando los animales se someten a exposiciones repetidas (grupo C). (Ver figura 19).

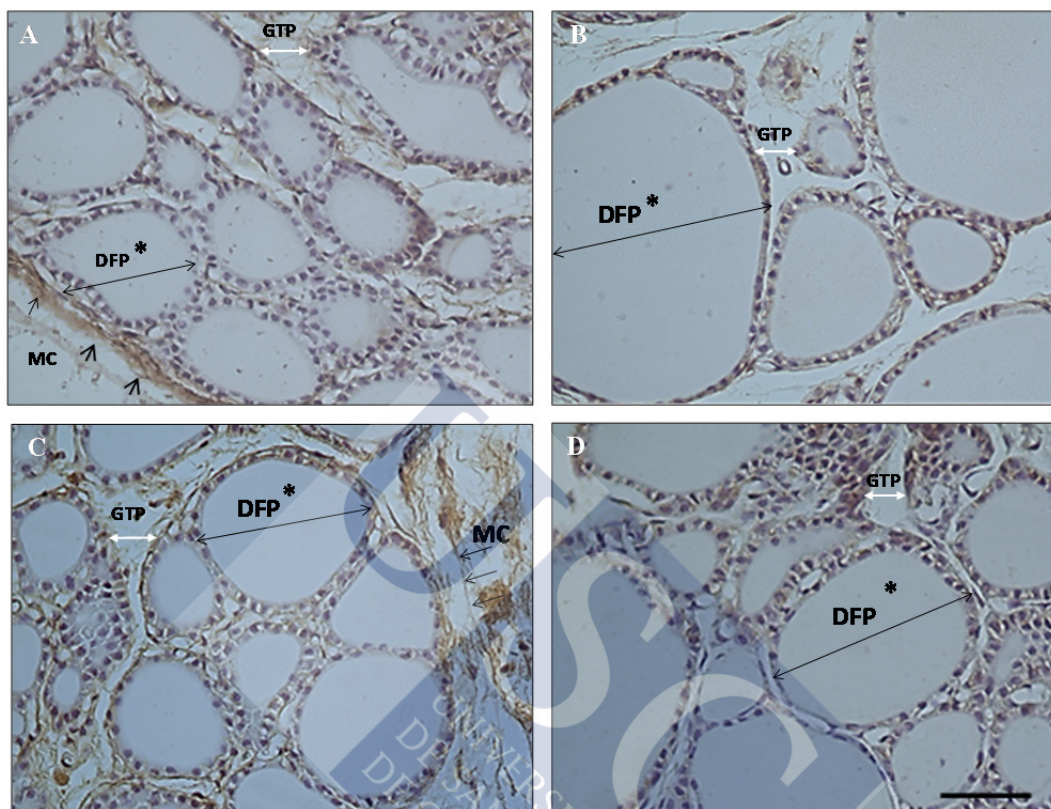


Figura 17. Fotografías de tejido tiroideo de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, que muestran las diferencias de tamaño de los folículos periféricos, aumentando después de la exposición aguda. Las fotos A y B (grupo A): A, animales sacrificados a los 90 min de la exposición a 0 W (control) y B, a 3 W. Las fotos C y D (grupo B) corresponden a animales sacrificados 24 h después de la exposición a 0 W (control) y 12 W respectivamente. El asterisco indica el diámetro del folículo periférico (DFP), las puntas de flecha indican la membrana capsular (MC), la flecha doble blanca el grosor del tabique periférico (GTP) de tejido conectivo. Aumento a 40X, barra de calibración 50 μ m.

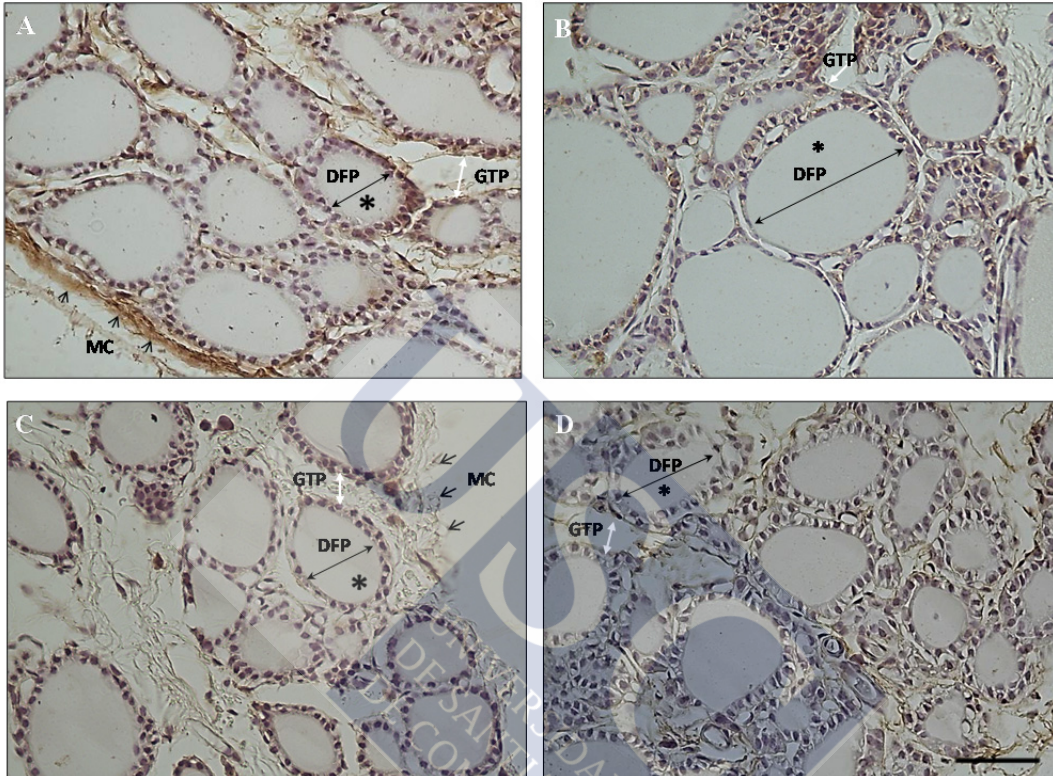


Figura 18. Fotografías de tejido tiroideo de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, que muestran las diferencias de tamaño de los folículos periféricos, incrementada después de la exposición aguda y repetida. Las fotos A y B: A, animales sacrificados a los 90 min de la exposición a 0 W (control) y B, a 3 W. Las fotos C y D, animales sacrificados a los 90 min de finalizada la exposición (exposición iniciada 2 semanas antes) a 0W (control) y a 3 W. Los asteriscos indican el diámetro de los folículos periféricos (DFP), las puntas de flecha indican la membrana capsular (MC), la flecha doble blanca el grosor del tabique periférico (GTP) de tejido conectivo. Aumento a 40X, barra de calibración 50 μ m.

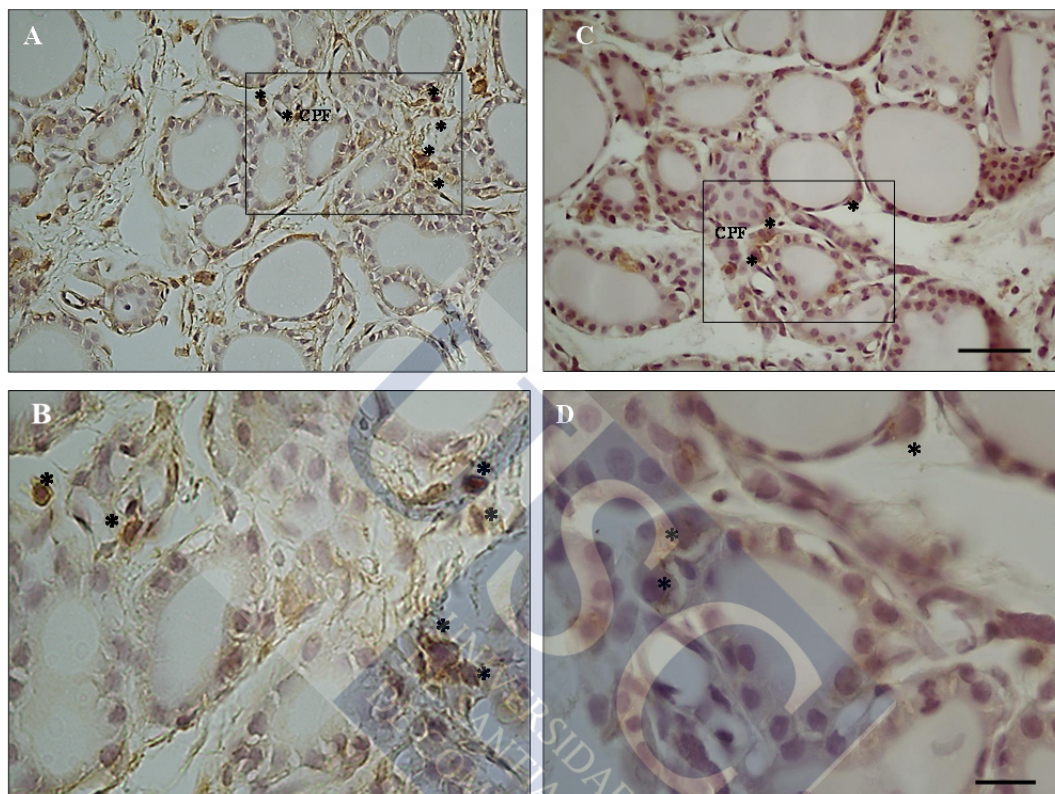


Figura 19. Las fotografías de tejido tiroideo de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, muestran las diferencias de expresión en las células parafoliculares de animales sacrificados a los 90 min de la exposición. La foto A exposición a 3 W y la C a 12 W con un aumento de 40X. Las fotos B y D a un aumento de 100X. Los asteriscos indican las células parafoliculares (CPF). Las barras de calibración (A, C)= 40 μ m, (B, D)= 20 μ m.

4.2.3. DISCUSIÓN.

En este trabajo hemos encontrado que la interacción de la radiación no ionizante a frecuencia de 2,45 GHz, empleada en un modelo experimental de diatermia en ratas Sprague-Dawley, causa modificaciones en la morfología del tejido de la glándula tiroides y en la distribución de la proteína constitucional de estrés celular Hsp90. La morfología de la glándula tiroides sufre los siguientes cambios, por efecto de la radiación: a) Un incremento de los folículos (centrales y periféricos) y una disminución del grosor en los tabiques periféricos como respuesta inmediata a la exposición aguda. Esta hipertrofia de los folículos periféricos continúa veinticuatro horas después, en las glándulas expuestas al SAR más elevado, recuperando los folículos centrales su tamaño. Por el contrario, los folículos centrales disminuyen su tamaño. b) El estímulo repetido de la glándula, con los niveles más bajos de SAR provoca un incremento de tamaño de los folículos periféricos. c) La distribución de la proteína de estrés celular, Hsp90 en las membranas y en las células de la glándula, se modifica por efecto de radiación aguda y repetida y disminuye a medida que se incrementa el SAR.

Que nosotros tengamos constancia, nuestro trabajo describe por primera vez el efecto de la radiofrecuencia a 2,45 GHz aguda, por exposición repetida, en la morfología de la glándula tiroides de ratas Sprague-Dawley. Los estudios que aparecen publicados hasta la fecha hablan de alteraciones histopatológicas en el tiroides de animales de experimentación aplicando ELF (50 Hz) (Rajcovic V. et col., 2006, 2003) o en los niveles de hormonas tiroideas (Mortavazi S. et col., 2009; Sinha R.K., 2008; Koyu A. et col., 2005) en humanos o en animales expuestos a ELF o RF.

Hemos elegido la interacción experimental de animales pequeños con radiofrecuencia a 2,45 GHz por tener un amplio espectro en su utilización, tanto en terapéutica, en diatermia de tejidos (por ser una frecuencia de resonancia del H₂O, que le permite tener una mayor penetración) como en telecomunicaciones en WIFI, UMTS o Bluetooth. Empleamos niveles de SAR subtérmicos aplicando potencias de 3 y 12 W a 2,45 GHz en la pata delantera izquierda, próxima a la glándula tiroides, para asegurarnos de que no existiese un efecto térmico directo causado por radiación no ionizante (Adair R.K, 2003) en la glándula. Sin embargo, el estudio del efecto de la radiofrecuencia va unido a la inmovilización del animal y parece generar un cierto estrés, como se determinó en otros experimentos (Misa-Agustiño M.J. et col., 2012; Gutiérrez- Mariscal et col.,

2012). Además debemos de tener en cuenta que la radiación puede provocar, de forma única o de forma repetida, en el hipotálamo de la rata, la activación de diferentes poblaciones neuronales (Jorge-Mora T. et col., 2011; Novikova N.S. et col., 2008) que intervienen a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo. De manera que los efectos de la radiación no ionizante, en esta glándula, no podemos considerarlos de forma aislada en el tejido sino teniendo en cuenta un sistema con múltiples entradas, que interaccionan entre sí. Así, está descrito en la literatura que la radiación de microondas a 2,45 GHz afecta a la fisiopatología del cerebro y provoca cambios en la función cerebral y comportamiento, con afectación del sistema tiroideo, directa o indirectamente, por alterarse la relación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo o por provocar alteraciones bioquímicas en el tiroides, debido a la exposición a microondas. (Sinha R.K., 2008).

Los folículos constituyen la unidad funcional de la glándula tiroides, el tamaño de los mismos varía con la actividad biológica. Sin embargo, el tamaño de los folículos no es homogéneo, a nivel periférico los folículos son de mayor tamaño y a nivel central son más pequeños, dependiendo su tamaño de la cantidad de coloide (Hartoft-Nielsen M.L. et col., 2005). El incremento del tamaño de los folículos periféricos y/o centrales de los animales, después de una exposición única o repetidas a la radiación, es un hallazgo que coincide con el de otros autores, que describen hipotiroidismo e incremento folicular a expensas del coloide (Eşmekaya M.A. et col., 2010; Rajkovic V. et col., 2003) tanto en la exposición de RF como ELF de 2-3 meses en animales. La explicación de este efecto podría estar en relación con un estado de inactividad transitorio en la glándula tiroides de las ratas, causado por la radiación, que desencadenaría una supresión en la eliminación o recambio de tiroglobulina en el coloide y un incremento compensatorio del diámetro folicular y/o hipotiroidismo (Suzuki K. et col., 2011). El incremento del tamaño de los folículos periféricos, en exposición aguda y/o repetida con frecuencia de 2,45GHz, indica que la capacidad de penetración de la radiación constituye un estímulo en la glándula, que puede causar un daño, que si persistiese en el tiempo podría alterar la función, hecho descrito recientemente por otros autores (Eşmekaya M.A. et col., 2010; Rajkovic V. et col., 2003).

Algunos autores han encontrado un incremento del tamaño de los folículos, asociado con una disminución de la función tiroidea en condiciones fisiológicas, en estudios experimentales morfológicos de la glándula tiroides relacionado con el envejecimiento (Kmiec Z. et col., 1998). Sin embargo, en el disbalance transitorio de la

regulación autocrina de los folículos de la glándula, que aparece en algunos estados fisiológicos y en patologías tiroideas, puede existir una participación exógena (Ohye H. et col., 2010). La aparición de este efecto nos sugiere la posibilidad de que la radiación no ionizante pudiese sumarse a otros tóxicos ambientales, que afectaría a la función y la morfología de la glándula tiroides (Jugan M.L. et col., 2010). Una deficiencia en el funcionamiento de la glándula tiroides puede tener una repercusión muy importante en el adulto, provocando alteraciones cardiovasculares (Lyn Patrick N.D., 2009), en el desarrollo fetal–neonatal en humanos (Conde–Agudelo A. et col., 2013), en modelos de roedores (Crofton K.M. et col., 2005), dando lugar a un desarrollo anómalo en el cerebro (Gilbert M.E. et col., 2012)

En los últimos años, se ha descrito que los campos electromagnéticos constituyen fuentes externas de formación de radicales libres en células sanguíneas (Lu Y-S. et col., 2012; Brescia et col., 2009), cerebro (Jiang D.P. et col., 2013; Cui et col., 2012), en espermatozoides (de Iuliis G.N. et col., 2009), en el tejido miocárdico (Kiray A. et col., 2012). La glándula tiroides es un órgano de naturaleza oxidativa, sin embargo, con un abuso oxidativo adicional provocado por prooxidantes exógenos (la radiación ionizante sería la más espectacular) se incrementaría el daño de las macromoléculas en la glándula y provocaría potencialmente enfermedades y cáncer de tiroides (Malgorzata et col., 2012). A pesar de esto, no se ha podido demostrar hasta la fecha una relación directa entre el cáncer de tiroides y la exposición a campos electromagnéticos (Lope V. et col., 2006). Sin embargo, hay una búsqueda de biomarcadores en las enfermedades tiroideas, que permitan un diagnóstico y detección precoz, para una terapéutica más temprana. Así, la proteína Hsp90, en condiciones fisiológicas, es esencial para procesos celulares fundamentales como la señalización hormonal, el control del ciclo celular, proliferación y diferenciación (Helmbrecht K. et col., 2000). En estudios anteriores describimos una disminución de las proteínas de estrés celular Hsp90 y 70 por efecto de la radiación aguda a 2,45 GHz en la glándula tiroides, sin una afectación aparente en la actividad apoptótica en las células de la glándula (Misa Agustiño M.J. et col., 2012). Se sabe que la proteína de estrés Hsp90, realiza un papel modulador contra el cáncer de tiroides (Samadi A. et col., 2009), siendo su función principalmente antiapoptótica (Park J.W. et col., 2003). En este trabajo, describimos que la inmunorreactividad de la proteína constitucional Hsp90, se distribuye en la histología de la glándula tiroides, después de la exposición aguda de 30 min, en los lugares donde existía una activación previa de las protein- kinasas (Sreedhar

A.S. et col., 2004), entre las membranas capsular y lobulillar y en las células foliculares y parafoliculares. En otros experimentos, también se ha descrito que la exposición a fuentes electromagnéticas, causa alteraciones morfológicas en la glándula tiroides afectando al epitelio, tejido conectivo, células foliculares e interfoliculares, así como a mastocitos (Rajkovic V. et col., 2003; Rajkovic V. et col., 2005; Rajkovic V. et col., 2006). La distribución cualitativa del marcaje de la proteína Hsp90 (en membranas, citoplasma de células foliculares y en núcleo de células parafoliculares), en áreas claves de la histología y funcionalidad de la glándula tiroides, indican que no se sitúan al azar sino para preservar la integridad de las membranas y del coloide, ante situaciones de estrés celular. La expresión inmunohistoquímica de esta proteína, en membranas y células, disminuye a medida que se incrementa la potencia o cuando la exposición es repetida, esto nos hace pensar que la respuesta al estrés celular, probablemente tenga relación con la acción combinada de otros sistemas, que interactúan alternativamente y/o que en algunos casos puede ejercer un efecto sinérgico y en otros antagonista (Kostoff R.N. et col., 2013). Así en estudios recientes en los que se cuantificó el estrés causado en los animales antes y después de la radiación, midiendo la temperatura rectal, apareció sólo para potencias altas (Misa-Agustiño M.J. et col., 2012). Debemos tener en cuenta que existe un balance, entre el estímulo causado por las microondas y el impacto negativo causado por el estrés por inmovilización, sobre las hormonas tiroideas (Gutiérrez –Mariscal M. et col., 2012), provocado por el cortisol y posiblemente por los estrógenos (Santin A.P. y Furnaletto T.W., 2011). Ambas hormonas relacionadas con las HSPs, pueden influir en el balance de estrés celular causado sobre la glándula.

La exposición repetida a la radiación, se suma a un estado de estrés crónico en los animales, que están inmovilizados y presentan una actividad facilitadora del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en respuesta a un feed-back inhibitorio por elevación de los corticoides (Jorge-Mora T. et col., 2011). La glándula tiroides, después de la exposición repetida, presenta hipertrofia significativa de los folículos periféricos en relación a los animales control-repetidos y un tamaño significativamente inferior que después de la exposición aguda. El efecto de la radiación es menos manifiesto en la morfología de la glándula, cuanto más se habitúa el animal al estímulo repetido. Contrariamente el daño celular en la glándula está en relación directa con la tasa de absorción específica (SAR) y/o el número de exposiciones aplicadas en el tejido.

Las células C o parafoliculares son las responsables de la regulación de las células foliculares, existiendo una interrelación entre las dos poblaciones endocrinas (Martín Lacave I. et col; 2009). El número y distribución de las células parafoliculares o células C en la glándula tiroides puede modificarse y en ocasiones ser contradictorio, así en hipotiroidismo disminuye el número de células parafoliculares (Zbucki R.L. et col; 2007) y por el contrario el hipotiroidismo materno causa en los recién nacidos un incremento de células parafoliculares (Usenko V.S. et col; 1999). Efectos ambientales externos dañinos, como la microgravedad o hipergravedad en el espacio, provocan una disminución de las células parafoliculares (Albi E. et col; 2013) y sin embargo, los campos electromagnéticos de baja frecuencia provocan un incremento del número de células foliculares (Rajkovic V. et col; 2005). La exposición en este experimento, de las glándulas tiroides de ratas, a radiofrecuencia de 2,45 GHz con SAR obtenido con potencias de 3W incrementa el marcaje de la proteína de estrés térmico Hsp90 en las células parafoliculares, sin embargo, al someter a los animales a SAR que se obtuvieron con potencias de 12 W o en exposiciones repetidas disminuye el inmunomarcaje de estrés de la proteína Hsp90 en las células parafoliculares. La proteína de estrés celular Hsp90 unida a la célula parafolicular es sensible a la intensidad y naturaleza del estímulo de la radiación, pudiendo este agente externo modular la función celular pero al mismo tiempo constituir un biomarcador de daño celular.



4.3. EXPERIMENTO 3

***EFECTO DE LA RADIOFRECUENCIA AGUDA A 2,45GHz
EN LAS PROTEÍNAS HSP90 Y HSP70 Y EN LA
MORFOLOGÍA DEL TIMO EN LA RATA.***



4.3.1. INTRODUCCIÓN.

Cuando el equilibrio entre el sistema inmunitario, nervioso y endocrino se altera por algún hecho externo al cuerpo, este intenta mantener la homeostasis. El timo, órgano esencial del sistema inmunitario, es muy sensible tanto a cambios fisiológicos en el humano, como la edad o el embarazo, como a agentes externos (Domínguez-Gerpe y Rey-Méndez, 2003).

En estos últimos años se ha descrito que la radiación puede constituir un estímulo externo que modula la respuesta inmunitaria y modifica las funciones del timo (Chen S.L. et col., 2000; Quaglino D. et col., 2004; Hekmatn et col., 2013). Las proteínas de estrés térmico (HSP) regulan el mantenimiento de la homeostasis ante estímulos internos o externos y mantienen un ambiente tisular adecuado en los mamíferos (Lindquist et col., 1988). Los campos electromagnéticos (EMF) pueden actuar, primariamente como inductores o mediadores de respuesta al estrés, a través de la producción de proteínas HSP (Lee et col., 2005), a pesar de que los mecanismos de inducción no son todavía muy conocidos. Las HSPs se asocian a respuestas en la medicina y en enfermedades (Welch et col., 1992), la mayoría de ellas se inducen bajo condiciones de estrés y tienen funciones de chaperonas y citoprotectoras (Morimoto y Santoro, 1998). Este estrés puede provocar un deterioro en la infraestructura celular y alterar la homeostasis. Por ello, las HSPs también se utilizan frecuentemente como biomarcadores en estudios de toxicología molecular (Gupta et col., 2010).

La aplicación de termoterapia profunda o diatermia, con microondas en la banda de 2,45 GHz en terapéutica de dolor, en procesos de rehabilitación, de reumatología o traumatología, se sabe que provoca beneficios locales en el lugar de aplicación. Recientemente se ha descrito que la inducción de HSPs con la aplicación de microondas puede tener un papel estimulador o inhibidor de la inmunidad (Pockley et col., 2008). Este hecho nos ha animado al estudio experimental de biomarcadores que determinen el umbral terapéutico y/o tóxico al aplicar campos electromagnéticos.

En este estudio analizamos los niveles de estrés celular alcanzados con las proteínas de estrés térmico Hsp90 y Hsp70, así como los cambios histológicos con tinción de hematoxilina-eosina (H-E) e inmunohistoquímica a nivel del timo de rata, después de la exposición a la radiofrecuencia a 2,45 GHz, en un modelo de diatermia experimental en rata

expuesta en una cámara GTEM. Mediciones paralelas del estrés corporal en los animales mediante sondas de temperatura rectal, nos permitirán determinar si existe alguna interacción entre los incrementos de temperatura de los animales y el estrés celular.

4.3.2. RESULTADOS.

4.3.2.1. Resultados de SAR.

La energía media absorbida por las ratas en los 4 grupos, estimadas por la ecuación 2, así como los pesos medios, los valores medios de SAR \pm EEM en el timo y cuerpo de las ratas, los valores de SAR \pm EEM máximo o pico, promediado en 1 gr de las mismas partes del animal, para los distintos grupos estudiados a 2.45 GHz de frecuencia en una cámara GTEM Shaffner.

Se utilizó un ANOVA de una vía para analizar los valores de los diferentes niveles de radiación, para SAR medio en timo o cuerpo y promedio de SAR máximo para un gramo de timo o cuerpo, mostrando diferencias significativas para todos los valores de SAR ($p < 0.001$), que aparecen en la tabla 24. Los incrementos de los valores de SAR (medio y máximo), son directamente proporcionales a la potencia de entrada para cada subgrupo.

	MEDIDAS EXPERIMENTALES DE TASA DE ABSORCION ESPECÍFICA POR FDTD			
	Media de SAR en el Timo(W/kg)	Pico SAR en 1g Timo	MEDIA de SAR en el cuerpo(W/kg)	Pico SAR en 1g del cuerpo
P= 1.5W E=40.28V/m	0,046 \pm 1.10 ⁻³	0,041 \pm 2.10 ⁻³	0,0169 \pm 7.10 ⁻⁴	0,089 \pm 9.10 ⁻³
P= 3W E=40.28V/m	0,104 \pm 5.10 ⁻³	0,076 \pm 4.10 ⁻³	0,0364 \pm 19.10 ⁻³	0,180 \pm 9.10 ⁻³
P=12W E=80.56V/m	0,482 \pm 12.10 ⁻³	0,340 \pm 10.10 ⁻³	0,161 \pm 4.10 ⁻³	0,795 \pm 2.10 ⁻³

Tabla 24. Valores del SAR en los timos y cuerpos de ratas experimentales calculados desde la potencia (P) y campo eléctrico (E). Expresados como Media \pm Error Estándar de la media (M \pm EEM) obtenidos del promedio del SAR y pico SAR de los animales. Los valores son comparados con un ANOVA de una vía cuyo factor de estudio es la potencia aplicada de radiación (0, 1,5, 3,12W). Seguido por un test de Holm-Sidak de comparaciones múltiples.

4.3.2.2. Cambios en la temperatura rectal postradiación: niveles de estrés.

La diferencia en los valores medios entre los diferentes niveles de potencia no fue lo bastante grande para excluir la posibilidad que la diferencia fuera debida solamente a la variabilidad de muestreo arbitraria, después de tener en cuenta los efectos de diferencias para los distintos tiempos post-exposición (90 min o 24 h). No hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,091$).

La diferencia en los valores medios entre los diferentes niveles de tiempo fue mayor del que se esperaría por azar, después de tener en cuenta los efectos de diferencias de potencia. Hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = <0,001$).

El efecto de los diferentes niveles de potencia no dependió de que el nivel de tiempo estuviera presente. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre la potencia y el tiempo. ($p = 0,886$).

Las comparaciones para el factor de potencia revelaron que no había diferencias significativas en la temperatura en cada grupo (1,5, 3 y 12W) en relación con el grupo de control (0W).

Las comparaciones relacionadas con el tiempo de radiación, revelaron diferencias significativas de temperaturas medias antes y después de la radiación (en 0 y 90 minutos: $p=0,00038$, $p=0,015$). No hubo diferencias significativas en las temperaturas medias después de la radiación y 24 h ($p=0,230$).

Las comparaciones para el factor tiempo con cada potencia, mostraron diferencias significativas solo para el SAR máximo ($0,482 \pm 12 \cdot 10^{-3}$ W/kg) en comparación a los 0 min radiación ($p=0,003$).

POTENCIA	MEDIDAS EXPERIMENTALES DE LA TEMPERATURA RECTAL EN RELACIÓN A LA RADIACIÓN			
	TIEMPO			
	<i>Antes</i>	<i>minuto 0</i>	<i>90 minutos</i>	<i>24 horas</i>
0W	$36,9 \pm 14 \cdot 10^{-2}$	$36, \pm 14 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 20 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 20 \cdot 10^{-2}$
1,5W	$37,0 \pm 4 \cdot 10^{-2}$	$37,5 \pm 18 \cdot 10^{-2}$	$37,3 \pm 10 \cdot 10^{-2}$	$37,0 \pm 14 \cdot 10^{-2}$
3W	$37,0 \pm 13 \cdot 10^{-2}$	$37,5 \pm 10 \cdot 10^{-2}$	$37,4 \pm 40 \cdot 10^{-2}$	$37,1 \pm 17 \cdot 10^{-2}$
12W	$36,8 \pm 19 \cdot 10^{-2}$	$37,7 \pm 12 \cdot 10^{-2*}$	$37,4 \pm 15 \cdot 10^{-2}$	$37,2 \pm 1 \cdot 10^{-2}$

Tabla 25. Temperaturas rectales de ratas experimentales, expresadas como Media \pm Error Estándar de la media ($M \pm EEM$), obtenidas de los promedios de las temperaturas de los animales. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías, siendo los factores estudiados la Potencia aplicada (0, 1,5, 3, 12 vatios) X el Tiempo antes y después de la radiación (0, 90 minutos y 24 horas).

4.3.2.3. Niveles de proteínas Hsp90 y Hsp70 determinadas por ELISA.

4.3.2.3.1. Resultados de la proteína Hsp90.

El análisis de los valores obtenidos de la proteína Hsp90 en el timo indicó que, la diferencia en los valores medios entre los distintos niveles de potencia (0, 1,5, 3 y 12 W) fue mayor de la que se esperaría por azar, después de tener en cuenta los diferentes efectos de tiempo después de la radiación (90min o 24 h). Presentando diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,037$). La diferencia en los valores medios entre los diferentes tiempos como después de la radiación no fue lo bastante grande como para excluir la posibilidad de que la diferencia fuera debida solamente a un muestreo arbitrario, después de tener en cuenta los efectos de diferencias de potencia. No hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,981$).

El efecto de los diferentes niveles de potencia no dependió de que el factor tiempo después de la radiación estuviera presente. No hubo una interacción

estadísticamente significativa entre la potencia y el tiempo después de la radiación ($p = 0,349$).

Las comparaciones de los valores de la proteína Hsp90 en relación al factor potencia mostraron diferencias significativas respecto al subgrupo control (potencia=0) con 1,5, 3 o 12 W ($p = 0,0124$, $p = 0,0194$, $p=0,0203$).

Grupo A (ratas sacrificadas y fijadas a los 90 minutos de terminar la radiación): La cantidad de Hsp90 expresado en el timo en ratas expuestas a la radiación de 12 W fue considerablemente diferente al de las ratas no radiadas (0 W) ($p < 0,035$). Pero los niveles de Hsp90 en timo en ratas expuestas a la radiación de 1,5 o 3 W no fueron significativamente diferentes del de las ratas no radiadas ($p = 0,170$, $p = 0,428$).

Grupo B (ratas sacrificadas y fijadas 24 horas después de terminar la radiación): La cantidad de Hsp90 expresado en el timo en ratas expuestas a la radiación de 3 W fue considerablemente diferente al de las ratas no radiadas (0 W) ($p < 0,012$). Pero no hubo diferencias significativas en los niveles de Hsp90 expresado en ratas radiadas a 1,5 o 12 W en relación a las ratas no radiadas (0W).

4.3.2.3.2. Resultados de la proteína Hsp70.

El análisis estadístico de los valores de la proteína Hsp70 alcanzados en el timo entre los diferentes niveles de potencia no fue lo bastante grande para excluir la posibilidad de que la diferencia fuese solamente debida a la variabilidad de muestreo arbitraria, después de tener en cuenta los efectos de diferencias en el tiempo después de la radiación. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,528$).

La diferencia en los valores medios de la proteína Hsp70 entre los distintos tiempos después de la radiación no fue lo bastante grande para excluir la posibilidad de que la diferencia fuera solamente debido a la variabilidad de muestreo arbitraria, después de tener en cuenta los efectos de las diferentes potencias. No hubo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,684$).

El efecto de los diferentes niveles de potencia no dependió de que el factor tiempo después de la radiación estuviera presente. No hubo una interacción estadísticamente significativa entre la potencia y el tiempo después de la radiación ($p = 0,152$).

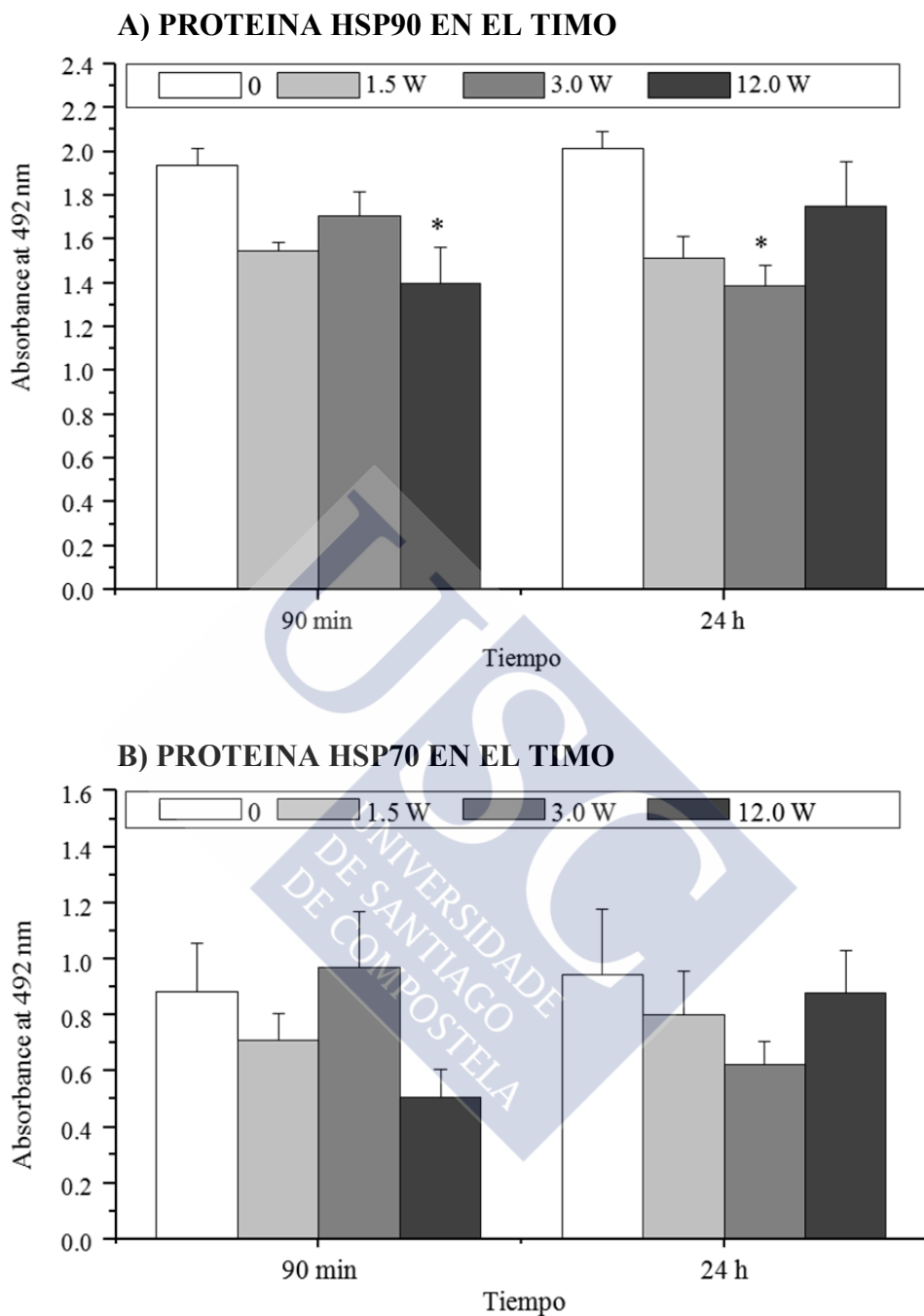


Figura 20. Los histogramas representan los niveles de Hsp90 (A) y Hsp70 (B) detectados por ELISA en el timo 90 min y 24 h después de la exposición a 0, 1.5, 3 y 12 vatios.

Cada barra de los histogramas representa la media \pm el error estándar de la media.

Los asteriscos indican las diferencias estadísticas ($p < 0.05$), encontradas usando un ANOVA de dos vías seguido por un test de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

4.3.2.4. Resultados de la tinción con H-E.

En cualquiera de los grupos estudiados animales no radiados o expuestos a 1,5, 3 o 12 vatios aparece la morfología típica del timo en lóbulos. En cada lóbulo la microscopía indica, una distribución en la periferia de la corteza con numerosos linfocitos y células retículo-epiteliales e internamente, en la médula, con numerosos linfocitos maduros, células retículoepiteliales y corpúsculos de Hassall. No aparecen diferencias morfológicas con los animales no radiados en la medición de la proporción o índice entre la cortical y la medular del timo después de la radiación. Como hallazgos cuantificables encontramos que en aquellos animales a los que se le aplicó el SAR más elevado ($0,482 \pm 12 \cdot 10^{-3}$) se observó un incremento del número de vasos, que se hacen más visibles en la médula, de células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico y de glóbulos rojos, al estudiar y comparar las secciones del tejido del timo teñido con H-E de animales radiados con las diferentes potencias (0, 1,5, 3,12W). El análisis estadístico de los hallazgos morfológicos encontrados y medidos en las secciones teñidas con H-E en el timo, se realizó con un ANOVA de dos vías y es el que seguidamente se describe:

- Hay diferencias significativas en el número de vasos en la medular del timo en relación con el SAR aplicado ($p < 0,001$), pero no en relación con el tiempo transcurrido ($p < 0,308$). El efecto de los diferentes niveles de la potencia aplicados depende del tiempo transcurrido y hay una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores ($p = 0,004$). Noventa minutos después de la radiación aparece un incremento estadísticamente significativo en el número de vasos en los animales a los que se aplicó el SAR más elevado ($0,482 \pm 12 \cdot 10^{-3}$), que se mantiene veinticuatro horas después de la radiación, al realizar comparaciones entre los distintos grupos sometidos a radiación y el grupo control o no expuesto ($p < 0,001$ en ambos casos). Tan solo hay una disminución significativa en el número de vasos veinticuatro horas después de la radiación cuando se aplica el SAR de $0,104 \pm 5 \cdot 10^{-3}$. (Ver fig. 22)
- La aparición de células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico en el timo está en relación con el SAR aplicado ($p < 0,001$) y con el tiempo transcurrido después de la radiación, apareciendo una interacción estadísticamente significativa entre ambos factores ($p = 0,068$). Noventa minutos después de la radiación provoca, solo con el SAR más elevado, la aparición estadísticamente significativa de

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

células retículo-epiteliales de aspecto hemorrágico en la medular del timo en relación con los animales no radiados o control ($p < 0,001$). Veinticuatro horas después de la radiación hay una disminución significativa ($p < 0,001$) de las células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico que aparecen en el tejido tímico sometidas a SAR de $0,482 \pm 12 \cdot 10^{-3}$.

- Aparecen glóbulos rojos extravasados en el tejido tímico radiado, el análisis estadístico de los recuentos indica que hay diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la potencia aplicada o el SAR ($p < 0,001$), pero el efecto no depende del tiempo después de la radiación ($p = 0,38$). Noventa minutos y veinticuatro horas después de la radiación aparece extravasación significativa de glóbulos rojos con pequeñas hemorragias aisladas al aplicar potencias de 3 y/o 12 vatios ($p < 0,005$, $p < 0,030$, respectivamente (Ver fig. 21).
- Después de la radiación la relación existente entre corteza y médula, en el timo de los animales expuestos se mantiene respecto a los animales no radiados. No aparece ningún efecto relacionado ni con la aplicación de diferentes niveles de SAR ($p = 0,418$) ni tampoco si se tiene en cuenta el tiempo post-exposición ($p = 0,446$).

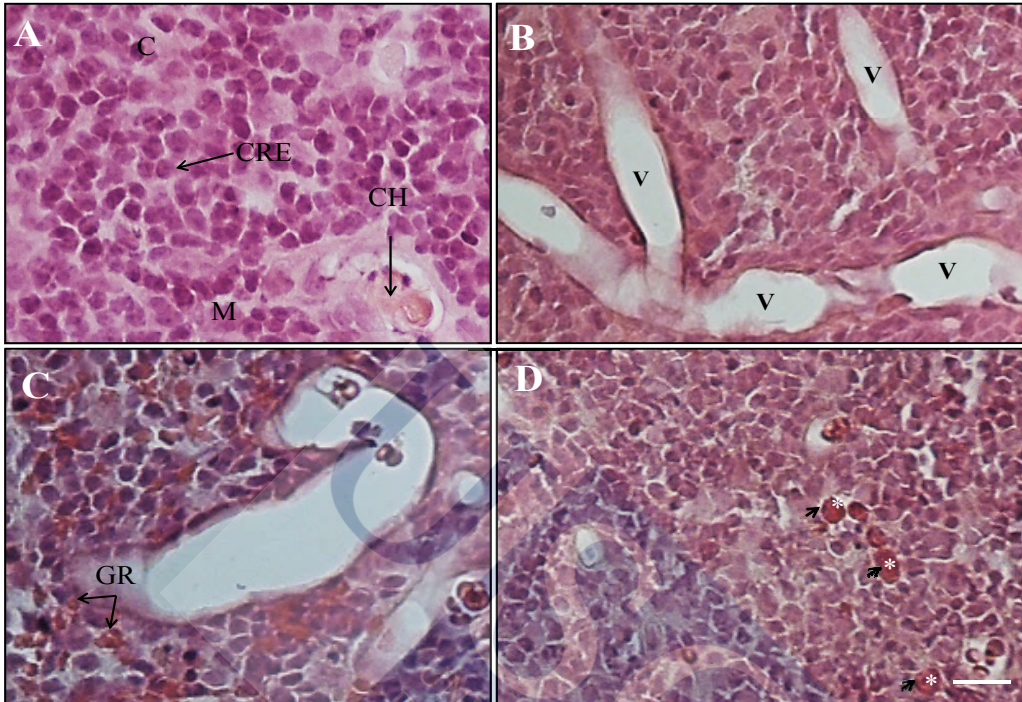


Figura 21. Fotografías de muestras histológicas de tejido tímico de rata con tinción de H-E, donde se muestran las principales diferencias entre los animales control (A) y el grupo expuesto al SAR más elevado (12W) las fotos B, C y D. Foto B donde se refleja el aumento de vasos (V). Foto C la extravasación de glóbulos rojos (GR). Y en la foto D la presencia de células retículo-epiteliales de aspecto hemorrágico. Corteza (C), Médula (M), célula reticuloepitelial (CRE), corpúsculos de Hasall (CH). Los * señalan CRE de aspecto hemorrágico. Aumento a 40X. Barra de calibración 50 μ m.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TIEMPO	NÚMERO DE VASOS EN LA MEDULAR DEL TIMO			
	POTENCIA			
	0W	1,5W	3W	12W
90 minutos	9,5±1,2	6±1,15	9,5±1,2 [#]	11,7±1,01*
24 horas	5±1,5	9,3±1,2*	5,7±1,2	13±1,2*

Tabla 26. Número de vasos en la medular del timo obtenidos como promedio del recuento en las secciones, teñidas con H-E y expresados como Media ± Error Estándar de la media (M±EEM). Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la potencia aplicada (0, 1,5, 3,12 vatios) X el tiempo después de la exposición (90minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre las potencias aplicadas (1,5, 3, 12 vatios) en la radiación y el control (0 vatios).

[#] Significa diferencias estadísticamente significativas a cada una de las potencias aplicadas entre ambos tiempos de post-exposición 90minutos y 24 horas

TIEMPO	NÚMERO DE CÉLULAS RETÍCULOEPITELIALES DE ASPECTO HEMORRÁGICO EN EL TIMO			
	POTENCIA			
	0W	1,5W	3W	12W
90 minutos	0,5±0,2	0,54±0,2	0,45±0,1	4,6±0,6*
24 horas	0,3±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	2±0,5 [#]

Tabla 27. Número de células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico en el timo, obtenidas como promedio del recuento en las secciones, teñidas con H-E y expresados como M±EEM. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la Potencia aplicada (0, 1,5, 3,12 vatios) X el Tiempo después de la exposición (90minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni.

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre las potencias aplicadas (1,5, 3,12 vatios) en la radiación y el control (0 vatios).

[#] Significa diferencias estadísticamente significativas a cada una de las potencias aplicadas entre ambos tiempos de post-exposición 90minutos y 24 horas.

TIEMPO	NÚMERO DE GLÓBULOS ROJO EN EL TIMO			
	POTENCIA			
	0W	1,5W	3W	12W
90 minutos	0±0,2	0,09±0,1	2,3±1*	5,3±2*
24 horas	0,4±0,1	0,3±0,1	8±2*	3,2±1,5*

Tabla 28. Número de glóbulos rojos en el timo obtenidos como promedio del recuento en las secciones, teñidos con H-E y expresados como $M \pm EEM$. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la Potencia aplicada (0, 1,5, 3, 12 vatios) X el Tiempo después de la exposición (90 minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni.

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre las potencias aplicadas (1,5, 3, 12 vatios) en la radiación y el control (0 vatios).

Significa diferencias estadísticamente significativas a cada una de las potencias aplicadas entre ambos tiempos de post-exposición 90 minutos y 24 horas.

TIEMPO	RELACIÓN DEL TAMAÑO DE CORTEZA/MÉDULA EN EL TIMO			
	POTENCIA			
	0W	1,5W	3W	12W
90 minutos	0,8±0,2	1±0,26	1,5±0,25	0,68±0,26
24 horas	0,7±0,2	1±0,26	0,8±0,26	0,9±0,25

Tabla 29. Proporción del tamaño de la corteza respecto al de la médula del timo, obtenidos como promedio del recuento en las secciones, teñidos con H-E y expresados como $M \pm EEM$. Los valores son comparados con un ANOVA de dos vías en relación a la Potencia aplicada (0, 1,5, 3, 12 vatios) X el Tiempo después de la exposición (90 minutos o 24 horas), y se realizaron comparaciones a posteriori con el test de Bonferroni

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre las potencias aplicadas (1,5, 3, 12 vatios) en la radiación y el control (0 vatios).

Significa diferencias estadísticamente significativas a cada una de las potencias aplicadas entre ambos tiempos de post-exposición 90 minutos y 24 horas.

4.3.2.5. Resultados de la inmunohistoquímica de Hsp90.

En cualquiera de los subgrupos estudiados no expuestos a radiación o expuestos a 1,5, 3 o 12 W, la expresión de la inmunohistoquímica de la proteína Hsp90 aparece con mayor inmunomarcaje a nivel de la corteza que en la médula.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión a nivel de la cápsula, membranas y tabiques es mucho más intensa en ratas no expuestas a radiación o expuestas a 1,5 o 3 W 90 minutos después de la radiación. Sin embargo, la expresión de la proteína en animales expuestos a 12 vatios en membranas y cápsula es muy baja, la expresión de la proteína en membranas se recupera 24 horas después en este grupo.

En la corteza, la distribución de la inmunoreactividad de la Hsp90 aparece de forma generalizada sobre todo por las células retículoepiteliales en todos los grupos, disminuyendo su marcaje en el grupo expuesto a mayor potencia. (Ver figura 23).

Noventa minutos después de la radiación a 3 W de potencia aparece un marcaje muy similar al control de 90 minutos, pero 24 h después el inmunomarcaje es inferior al control. (Ver figura 23).

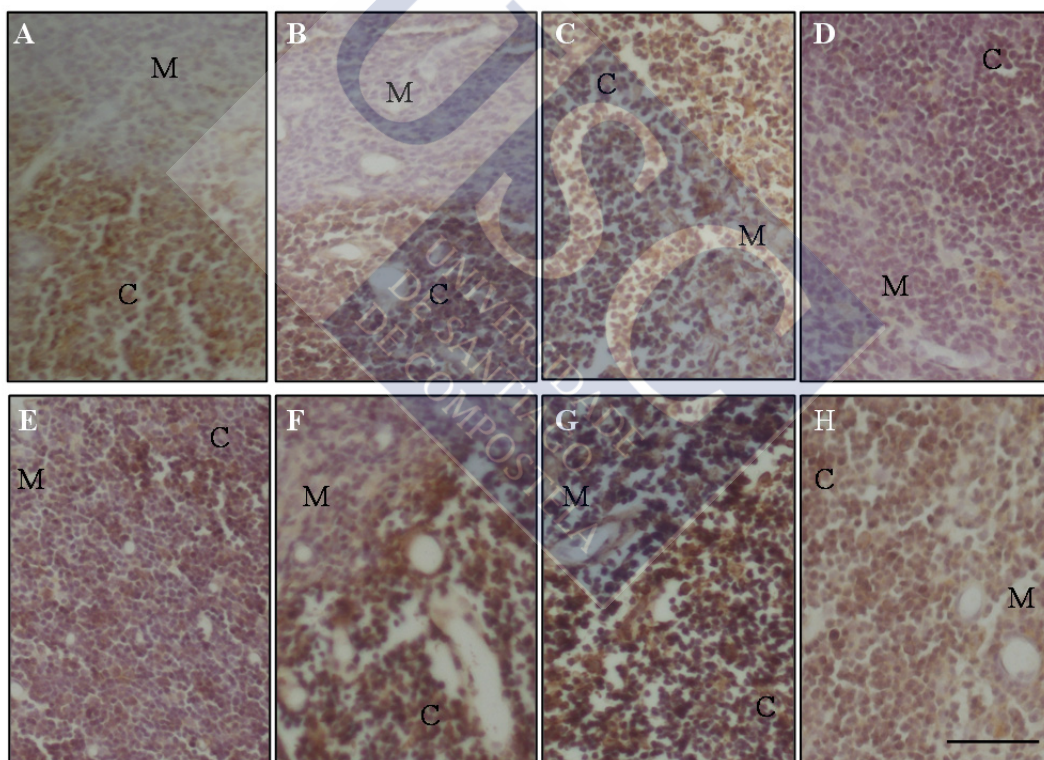


Figura 23. Fotografías de tejido tímico de rata con inmunohistoquímica de Hsp90, que muestran las diferencias de inmunomarcaje en los subgrupos estudiados no expuestos a radiación (A) y (E) o expuestos a 1,5 (B y F), 3 (C y G) o 12 vatios (D y H). Las fotos A, B, C y D: animales sacrificados a los 90 min de la exposición, A a 0 W (control), B a 1,5 W, C a 3W y D a 12 W. Las fotos E, F, G y H: animales sacrificados a las 24 h de finalizada la exposición, E a 0W (control), Fa 1,5W, G a 3 W y H a 12 W. La expresión inmunohistoquímica de la proteína Hsp90 aparece con mayor inmunomarcaje a nivel de la corteza que en la médula .Corteza (C), Médula (M). Aumento a 20X, barra de calibración 75µm.

4.3.3. DISCUSIÓN.

En este trabajo se describen por primera vez los cambios en la morfología y los niveles de proteínas de estrés celular Hsp90 y Hsp70 en los timos de ratas que han sido expuestas, con una interacción máxima en la pata izquierda, a radiofrecuencia (RF) de 2,45 GHz en una cámara GTEM. A estas modificaciones proteicas le acompañan signos histológicos que indican un incremento de la permeabilidad y vascularización tímica, que se reflejan en la aparición de glóbulos rojos y células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico, así como, un incremento de vasos en el tejido tímico. Con estos datos de la respuesta tisular del timo, ante estímulos físicos como la radiación no ionizante, realizamos un análisis de aquellos aspectos relevantes en este modelo de diatermia en ratas.

Todo indica que el descenso agudo de la proteína constitucional Hsp90, después de noventa minutos de radiación, con exposición al máximo nivel de SAR ($0,482 \pm 12 \cdot 10^{-3}$ W/kg), se debe a mecanismos subtérmicos, a pesar de que la diferencia de temperatura rectal entre los animales radiados y no radiados es significativa a estos niveles de radiación, tanto en este experimento como en otros realizados (Misa-Agustiño M.J. et col., 2012). Igualmente, la falta de recuperación de la proteína de estrés Hsp90, con el SAR de $0,104 \pm 5 \cdot 10^{-3}$, 24 horas después de la radiación, indica la participación de mecanismos no térmicos en el tejido, que provocaría una tolerancia celular o adaptación posterior al estrés (Ramaglia V. et col., 2004).

Se han descrito una gran variedad de estímulos ambientales, de naturaleza física, que pueden provocar en el organismo de los mamíferos, animales o humanos, estrés celular y modificación en los niveles de las proteínas Hsp90 y Hsp70, como el ruido (Yang S.H. et col., 2004), hipertermia (Kregel K.C. et col., 2002), radiación ultravioleta (Trautinger F. et col., 1996), radiación ionizante (Calini V. et col., 2003) y radiación láser (Novoselova E.G. et col., 2006).

La radiación no ionizante también provoca en numerosos tejidos, como la glándula tiroidea (Misa-Agustiño M.J. et col., 2012), el cerebro (Jorge-Mora T. et col., 2010), la piel (Shi B. et col., 2003), miocardio (George et col., 2008) una modulación de los niveles de las proteínas de estrés térmico. Aunque, frecuentemente el estrés tisular va acompañado de un incremento de las HSP, sin embargo, hemos encontrado en este trabajo y con anterioridad (Misa Agustiño M.J. et col., 2012 y Jorge-Mora T. et col., 2010)

un descenso transitorio, dentro de las veinticuatro horas después de la radiación, de los niveles de proteínas de estrés celular en diversos tejidos. Este hecho que parece contradictorio, sin embargo, es descrito también por otros autores como respuesta celular a otros estímulos como la anoxia o la isquemia (Yang S.H. et col., 2005; Ramaglia V. et col., 2004). La explicación es que puede existir una adaptación o reajuste de la respuesta de las proteínas de estrés celular, antes de preparar la maquinaria celular para un cambio ambiental adecuado. Debemos de tener en cuenta que en la capacidad de respuesta del organismo de los mamíferos, ante estímulos de estrés, intervienen el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmunológico, esto significa que pequeños reajustes transitorios de estos circuitos pueden intervenir en el control final de la tolerancia al estrés.

Las proteínas de estrés celular son potentes moléculas inmunomoduladoras que pueden tener efectos estimulatorios o inhibitorios en la respuesta inmune, dependiendo del contexto de la respuesta inmunitaria (Pockley A.G. et col., 2008). El timo tiene un importante papel en el sistema inmunitario y puede ser modulado por agentes ambientales como los campos electromagnéticos. En estos últimos años se ha descrito a nivel experimental que los campos electromagnéticos actúan en el timo de mamíferos, pudiendo interferir en su involución y en la muerte celular (Quaglino D. et col., 2000, 2004) provocando daño en el ADN (Hekmat A. et col., 2013).

El incremento de la activación fagocítica y la producción de interleukina de los macrófagos (Frahm J. et col., 2006) así como el efecto inmunosupresor y reducción de las células Natural killer en ratas preñadas a 0,6 W/cm² (Hiroyuki N. et col., 2003), son algunos de los efectos inmunitarios descritos causados por la exposición de campos electromagnéticos, a baja y alta frecuencia, en animales de experimentación. En el modelo de diatermia utilizado en este experimento en animales, hemos encontrado al examinar el tejido del timo mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina, que al incrementar el SAR de la radiación aparece un aumento significativo ($p < 0,030$) de glóbulos rojos en el tejido y una aparición significativa ($p < 0,001$) de las células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico en médula. Todos estos cambios histológicos, en la permeabilidad del endotelio vascular, se acompañan de un incremento del número de vasos en la médula tímica, por efecto de un aumento del flujo sanguíneo local y/o dilatación de los vasos, causado por la radiación. Estos hallazgos orientan a que la radiación no ionizante provoca una respuesta celular proteica al estrés agudo (dentro de

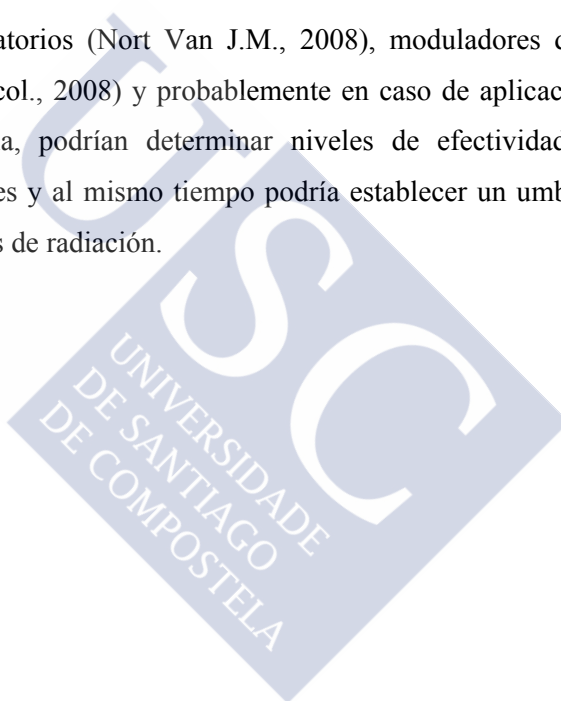
las 24 horas), pero también se produce un efecto inmediato y visible en la morfología del timo, incrementando la permeabilidad endotelial y vascularización. La combinación de ambos mecanismos puede modular la respuesta inmunitaria del timo.

Se debe tener en cuenta que, el efecto provocado por la radiación no ionizante, en el tejido tímico de los animales, podría ser el resultado de la interacción simultánea de varios mecanismos, un incremento de los niveles de cortisol (Mostafá R.M. et col., 2002) provocado por la propia fuente electromagnética (de Bruyn L. y de Jager L., 1994) así como la inmovilización del animal y un incremento del estrés oxidativo (Aydin C. et col., 2011). Las células del sistema inmune son especialmente sensibles a los cambios en el status antioxidante como resultado del incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente en los órganos linfoides después de la exposición a la radiación no ionizante (Pieri C. et col., 1993). Los niveles obtenidos de proteínas de estrés térmico después de la radiación, tienen una repercusión importante ya que indican el nivel de citoprotección (Shore A.E. et col., 2012) que tiene lugar en el timo, pero también la intervención en la respuesta inmune (Moseley P., 2000). Esta respuesta se modifica a lo largo del tiempo, estímulos nocivos que provocan ambientes laborales de estrés en los humanos como el ruido, inducen en exposición aguda un incremento de la respuesta inmune que dura unos tres días, con activación de macrófagos e incremento de niveles de cortisol (Zheng K.C. y Arizumi M., 2007). La exposición crónica a campos electromagnéticos u otros estímulos como el ruido provoca estrés crónico e induce efectos neuroendocrinos en humanos y animales (Liu T. et col., 2008). Por otro lado, la elevación de los niveles de corticoides (Bowers S.L. et col., 2008) acelera la producción de radicales libres (McIntosh L.J. et col., 1996) y suprime la función inmune (Szemerszkya R. et col., 2010).

La falta de diferencias significativas, en las proteínas Hsp90 y Hsp70, en el timo de animales expuestos a diferentes niveles de SAR de fuentes de campos electromagnéticos con animales no expuestos a la radiación, indica que se alcanza un escaso nivel de citoprotección a las veinticuatro horas en la glándula. Ambas chaperonas tienen funciones diferentes en la apoptosis y muerte celular, la sobreexpresión de Hsp90 indica un incremento de la apoptosis e inhibe la activación de las caspasas, pero sin embargo, la Hsp70 protege a las células de estímulos letales (Parcellier A. et col., 2003).

La expresión inmunohistoquímica de la Hsp90, única chaperona que mostró algún cambio en la cuantificación por ELISA, indica una distribución preferentemente en

la parte cortical, en las células retículoepiteliales y en las membranas, localizándose preferentemente en el tejido de sostén, donde se sitúan los linfocitos inmaduros. Este hecho puede indicar que esta proteína constitucional trata de preservar las células inmunitarias inmaduras. Al incrementar los niveles de SAR progresivamente disminuye el marcaje inmunohistoquímico de la proteína Hsp90 en las localizaciones habituales del timo. Recientemente, diversos autores asocian la radiación no ionizante como un estímulo positivo para inducir la apoptosis, muerte celular e incrementar las formas maduras de linfocitos (Quaglino D et col., 2000, 2004). La disminución de esta proteína y su función protectora inhibiendo las caspasas, puede indicar un estímulo para la activación de esta vía, constituyendo un biomarcador de modulación tímica. Los niveles de Hsp90 pueden indicar efectos antiinflamatorios (Nort Van J.M., 2008), moduladores de la respuesta inmune (Pockley A.G. et col., 2008) y probablemente en caso de aplicación de terapias físicas, como la diatermia, podrían determinar niveles de efectividad de respuesta inmunitaria en los pacientes y al mismo tiempo podría establecer un umbral terapéutico así como de niveles tóxicos de radiación.



5. DISCUSIÓN GENERAL





Los efectos térmicos derivados de la exposición a radiación no ionizante, como las microondas, están claramente demostrados, estableciéndose medidas de protección para prevenir posibles daños sobre la salud en seres humanos, que están recogidas en la legislación. El interés por demostrar la existencia de efectos no térmicos, derivados de la exposición a este tipo de radiación, surge posteriormente, cuando varios autores observaron alteraciones a nivel de la expresión de proteínas de estrés térmico, tras exposiciones con niveles de SAR por debajo del umbral térmico (de Pomerai D. et col., 2003; Caraglia M. et col., 2005). Esto ha llevado a establecer un intenso debate sobre los posibles efectos no térmicos, derivados de la exposición a CEM no ionizantes, que a largo plazo pudiesen resultar perjudiciales para la salud. En esta tesis, empleamos valores de SAR por debajo del umbral térmico, de modo que nuestros resultados podrían aportar un poco de luz sobre los posibles efectos no térmicos derivados de la exposición a radiación no ionizante. Los marcadores biológicos de estrés celular, empleados en esta tesis, fueron las proteínas de estrés térmico Hsp90 y Hsp70, ya que es conocida la estimulación de la expresión de algunos genes de respuesta al estrés, como las HSPs, por exposición a microondas. Desconocemos estudios previos que determinen los niveles de estrés celular en la glándula tiroidea y en el timo, cuantificando los índices de estas proteínas, en animales expuestos in vivo a la acción de una fuente electromagnética, como las microondas a 2,45 GHz, empleando niveles de SAR subterármicos (desde $0,046 \pm 1 \cdot 10^{-3}$ hasta $0,795 \pm 2 \cdot 10^{-3} \text{W/kg}$).

La frecuencia de 2,45 GHz tiene un amplio espectro en su utilización, tanto en terapéutica, en diatermia de tejidos (por ser una frecuencia de resonancia del H_2O , que le permite tener una mayor penetración) o con otros fines, en sistemas de telecomunicaciones como WIFI, UMTS o Bluetooth. En esta tesis nos centramos en los efectos subterármicos y en la obtención de marcadores biológicos con aplicación terapéutica

5.1. OBTENCIÓN DE UN MODELO BIOLÓGICO EN ANIMALES PEQUEÑOS CON SAR SUBTÉRMINICO Y BAJOS NIVELES DE ESTRÉS.

En este tipo de estudios experimentales es determinante precisar la dosis de radiación absorbida, no sólo porque constituye el índice biológico de energía absorbida, sino que al realizarlo en animales pequeños (ratas), con pesos menores a 250 gr., es un factor fundamental, la dosimetría y el índice de absorción. En los experimentos de esta tesis utilizamos para el cálculo de SAR estimaciones de SAR basadas en modelos matemáticos de simulación como el método FDTD (Schönborn S. et col, 2004). El cálculo de SAR nos ayuda a saber si los efectos en el tiroides y timo de los animales, se encuentran dentro de rangos térmicos o subtérmicos. Así, en los valores de SAR calculados mediante el método FDTD, de los 3 experimentos, se observaron diferencias significativas, con incrementos promedio y máximos tanto en glándula tiroides como en el timo, y en el cuerpo entero de las ratas, directamente proporcionales a la potencia inicial aplicada y al valor del campo eléctrico, para cada subgrupo. Encontrándose todos los valores de SAR calculados dentro de rangos subtérmicos (Martínez A., 2004).

En los niveles de estrés a través de temperaturas rectales, solo se apreciaron diferencias significativas cuando el nivel de potencia aplicado fue máximo (con 12 W) y a los 0 minutos de la exposición. Al cabo de 30 minutos ya no se objetivaron diferencias respecto al resto de grupos expuestos a radiación con microondas, probablemente por la puesta en marcha de mecanismos termorreguladores.

La temperatura ambiente también puede influir en los resultados, por ello fue controlada dentro de la cavidad de radiación y al no detectarse variaciones se consideró que este factor no influiría en los resultados.

El estudio simultáneo del cálculo de SAR en el cuerpo entero, en la glándula tiroides y en el timo de los animales, así como las variaciones de temperatura rectal antes y después de la radiación aseguran las condiciones de un modelo subtérmico.

Además debemos tener en cuenta que, en el estudio del efecto de la radiofrecuencia, en estos experimentos tenemos el factor de estrés asociado a la inmovilización del animal y parece generar un cierto estrés, como se determinó en otros experimentos (Misa-Agustino M.J. et col., 2012; Gutiérrez- Mariscal et col., 2012).

5.2. BIOMARCADORES DE ESTRÉS CELULAR: EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HSP90 Y HSP70 EN LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL TIMO DE RATA.

Diversos estudios relacionan la exposición a microondas con alteraciones en la expresión de genes relacionados con el estrés, entre ellos los genes del shock térmico (Lee S. et col., 2005; Belyaev I.Y. et col, 2006). Estos genes son muy sensibles al estrés metabólico, lo que hace que sean muy empleados como marcadores biológicos de estrés celular (Hossmann K.A. y Hermann D.M., 2003).

Existe una extensa variedad de estímulos capaces de provocar estrés celular y por ello modificaciones en la síntesis de las HSPs, relacionados tanto con la función citoprotectora como la antiapoptótica (Trautinger F. 1996; Pardue S. 2007) de las proteínas Hsp90 y Hsp70 (Caraglia M., 2005; Pardue S., 2007).

En nuestros experimentos, mediante la determinación de la expresión de los marcadores de estrés celular, Hsp90 y Hsp70, detectamos modificaciones relevantes tras la exposición a campos electromagnéticos de 2,45 GHz. Observamos, un descenso importante en los niveles de ambas proteínas, después de transcurridos 90 minutos de la exposición a microondas, tanto en la glándula tiroides como en el timo. Así, en la glándula tiroides este descenso en los niveles de las HSPs se observó a niveles de potencia bajos (con SAR máximo en el cuerpo $0.089\pm 9\cdot 10^{-3}$ o $0.180\pm 9\cdot 10^{-3}$ y en la glándula tiroides, $0.041\pm 2\cdot 10^{-3}$ o $0.076\pm 4\cdot 10^{-3}$ W/kg). En el timo, el descenso agudo de las HSPs fue más marcado para exposiciones con nivel de SAR más elevado (con SAR máximo en el cuerpo $0,795\pm 2\cdot 10^{-3}$ y en la glándula timo $0,340\pm 10\cdot 10^{-3}$ W/kg). Por tanto, este descenso en la expresión de las proteínas Hsp90 y Hsp70, nos pueden indicar una mayor susceptibilidad a potencias bajas para la radiación con microondas por parte de las células de las glándulas tiroides, respecto al timo.

Por otra parte, también observamos en ambos tejidos, que después de la exposición a 3 W de potencia y transcurridas 24 horas, presentaban niveles de ambas proteínas, Hsp90 y Hsp70, por debajo de los niveles basales, o sea de los controles, siendo los niveles de Hsp90 los que permanecían con descensos significativos respecto a los grupos no sometidos a radiación, por lo que pensamos que a esta potencia (3 W) el tejido glandular es más resistente a la recuperación. De este modo, de los experimentos que se llevaron a cabo en esta tesis, observamos que los niveles de Hsp90 de las células

tiroideas son más sensibles a la exposición con microondas a 3 W de potencia, al igual que fue observado con anterioridad en exposiciones repetidas de tejido nervioso (Jorge-Mora T., 2011), no ocurriendo lo mismo con la Hsp70. Así, concretamente a nivel de las células parafoliculares o C observamos que la expresión de la Hsp90 fue mayor para potencias de 3 W que para 12 W.

La Hsp70 se recuperó rápidamente después de su descenso inicial con el SAR más bajo, pasadas las 24 horas de la exposición, probablemente relacionado con el efecto reparador o citoprotector de la proteína (Rajdev y Sharp, 2000).

El descenso de las proteína Hsp90 y Hsp70 se encuentra descrito en otros estudios, en los que también se observaron descensos en estas HSPs 12 horas después de una situación de anoxia (Ramaglia y Buck, 2004) y durante la isquemia cerebral (Yang, 2005). Esto nos sugiere que el incremento en la expresión de HSP no es crítica en la adaptación temprana, sino que estas proteínas del estrés juegan su principal papel promoviendo la tolerancia más a largo plazo. Además hay que tener en cuenta que en la capacidad de respuesta de organismos mamíferos, ante estímulos estresantes, intervienen el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmunológico, y por tanto, pequeños reajustes transitorios de estos circuitos pueden intervenir en el control final de la tolerancia al estrés.

En este caso, las microondas también podrían actuar a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo, ya que se sabe que existe una relación importante entre la actividad de la Hsp90 y el grado de estimulación hipofisaria de las células tiroideas (Ginsberg, 2006). Además la radiación puede provocar, en exposición única o de forma repetida, la activación de diferentes poblaciones neuronales en el hipotálamo de la rata (Jorge-Mora T. et col., 2011; Novikova N.S. et col., 2008) interviniendo a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo. Por tanto, no podemos considerar los efectos de la radiación no ionizante de forma aislada en el tejido tiroideo, sino teniendo en cuenta un sistema con múltiples entradas, que interaccionan entre sí. Así, encontramos en la literatura que, la radiación con microondas a 2,45 GHz afecta a la fisiopatología del cerebro y provoca cambios en la función cerebral y en el comportamiento, con afectación del sistema tiroideo, tanto directa como indirectamente, por alteración la relación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo o por provocar alteraciones bioquímicas en el tiroides, debido a la exposición a microondas. (Sinha R.K., 2008).

La Hsp90 en la glándula tiroidea, se expresa constitutivamente a niveles mucho más altos de los que requieren sus funciones celulares normales y en un ambiente de estrés esta proteína puede desestabilizarse y alterar la relación entre genotipo y fenotipo, expresando descenso de los niveles como en estos experimentos, después de la radiación, (Jarosz D.F. y Lindquist., 2010). El descenso de los niveles de las chaperonas puede indicar que la magnitud de la respuesta, de las HSPs, de diferentes tipos celulares, puede afectar a su subsistencia después del estrés (Pardue S., 2007).

Por otra parte las proteínas Hsp90 y Hsp70 no mostraron cambios en tiroides, respecto a los controles, cuando el SAR fue máximo o en los casos de exposiciones repetidas, pudiendo representar esto cierto grado de adaptación celular. Esta misma respuesta, sin cambios de expresión de Hsp90 respecto al grupo no radiado, también aparece en exposiciones repetidas de tejido nervioso (Jorge-Mora T. et col., 2011). Así, en distintos estudios animales en tejidos del sistema nervioso, se ha observado gran diversidad y vulnerabilidad a la respuesta al estrés en la inducción de las HSPs (Jorge-Mora T., 2010; Gutschmann-Conrad, 1998).

Además de incrementos de las proteínas Hsp90 y Hsp70 en diversas patologías tiroideas (Medeiros-Neto G. et col., 1996; Boltze C. et col., 2003; Baryshev M. et col., 2004), también está descrito que puede disminuir la respuesta de las HSPs (Gutschmann-Conrad A. et col., 1998; Pardue S. et col., 2007) en diversos tejidos en situaciones de hipertermia, envejecimiento o enfermedad, lo que lleva a pensar que el incremento en la síntesis de las HSPs puede ser necesario en alguna respuesta celular, pero no en todas (Carper S.W. et col., 1987).

En nuestros experimentos, a pesar del descenso en la inducción de la respuesta de los niveles de las proteínas de estrés, no encontramos indicios de lesiones ni apoptosis celular, al contrario que otros autores que asocian niveles altos de Hsp90 y Hsp70 con un incremento en la función citoprotectora y antiapoptótica de estas chaperonas (Pardue S., 2007; Trautinger F., 1996). También se ha descrito que la exposición a campos electromagnéticos a 900 MHz provoca cambios en la estructura glandular asociados a un incremento de la vía caspasa dependiente de la apoptosis (Eşmekaya M.A., 2010).

En el tiroides, la expresión inmunohistoquímica de la Hsp90, presenta una distribución más intensa en los lugares donde existía activación previa de las protein-kinasas (Sreedhar A.S. et col., 2004), o sea, en las membranas capsular e interlobulillar y en las células foliculares y parafoliculares. Esta distribución cualitativa del marcaje de la

proteína Hsp90, en áreas claves de la histología y funcionalidad de la glándula tiroides, indica que se sitúan en zonas estratégicas para preservar la integridad de las membranas y del coloide, ante situaciones de estrés celular. La expresión inmunohistoquímica de la Hsp90, disminuye a medida que se incrementa la potencia o cuando la exposición es repetida, lo que nos hace pensar que en la respuesta al estrés celular, probablemente tengan relación con la acción combinada de otros sistemas, que interactúan alternativamente y/o que en algunos casos puede ejercer un efecto sinérgico y en otros antagonista (Kostoff R.N.et col., 2013).

En el timo, la expresión inmunohistoquímica de la Hsp90, indica una distribución preferentemente en la parte cortical, en las células retículoepiteliales y en las membranas, o sea, localizándose preferentemente en el tejido de sostén, donde se sitúan los linfocitos inmaduros, hecho que podría indicar que, esta proteína constitucional, trata de preservar las células inmunitarias inmaduras. Con el incremento progresivo de los niveles de SAR, disminuye el marcaje inmunohistoquímico de la proteína Hsp90 en las localizaciones habituales del timo. Recientemente, han relacionado la radiación no ionizante como un estímulo positivo para inducir la apoptosis, muerte celular e incrementar las formas maduras de linfocitos (Quaglino D et col., 2000, 2004). Por tanto, la disminución de esta proteína y su función protectora, inhibiendo las caspasas, puede indicar un estímulo para la activación de esta vía, constituyendo un biomarcador de modulación tímica. Además los niveles de Hsp90 pueden indicar, efectos antiinflamatorios (Nort Van J.M., 2008), moduladores de la respuesta inmune (Pockley A.G. et col., 2008) y probablemente en caso de aplicación de terapias físicas, como la diatermia, podrían determinar niveles de efectividad de respuesta inmunitaria en los pacientes y al mismo tiempo podría determinar el umbral de niveles tóxicos de radiación.

5.3. CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA TIROIDES Y EN EL TIMO DE RATA TRAS EXPOSICIÓN A MICROONDAS.

En esta tesis se describen por primera vez los cambios en la morfología de la glándula tiroides y del timo de ratas, que han sido expuestas a radiofrecuencia (RF) de 2,45 GHz en un sistema experimental de radiación con una cámara GTEM.

GLÁNDULA TIROIDES:

Los folículos constituyen la unidad funcional de la glándula tiroides y el tamaño de los mismos varía en función de la actividad biológica. Los folículos de la glándula no tienen un tamaño homogéneo, sino que a nivel periférico son de mayor tamaño y a nivel central son más pequeños, dependiendo su tamaño de la cantidad de coloide (Hartoft-Nielsen M.L. et col., 2005).

En la glándula tiroides de rata, tras la exposición a CEM durante una única exposición de 30 minutos, tras el análisis de las preparaciones de H-E y tinción con DAPI con un microscopio óptico, no observamos alteraciones visibles a nivel celular ni signos de apoptosis, a pesar del descenso de los niveles de las proteínas de estrés, contrariamente a otros autores, que asocian niveles altos de Hsp90 y Hsp70 con un incremento de la función citoprotectora y antiapoptótica de estas chaperonas (Pardue S., 2007; Trautinger F., 1996).

En cuanto al estudio de **parámetros morfológicos**, la glándula tiroides sufrió cambios significativos, por efecto de la radiación respecto al grupo control. Se observó un incremento del diámetro de los folículos de toda la glándula y una disminución del grosor en los tabiques periféricos como respuesta inmediata a la exposición aguda, tanto a potencias de 3 W como 12 W. Esta hipertrofia de los folículos periféricos continúa veinticuatro horas después, en las glándulas expuestas al SAR más elevado. Por otro lado, con el estímulo repetido de la glándula, sólo se objetivaron diferencias significativas en el tamaño de los folículos periféricos, que se encuentran incrementados de tamaño respecto al grupo control, pero su incremento de tamaño es significativamente menor que el observado en las glándulas radiadas en una exposición aguda. Y en el resto de los parámetros morfológicos estudiados no se objetivaron diferencias significativas, lo que nos indicaría que el estímulo de la exposición repetida a microondas provoca adaptación del tejido glandular.

El incremento del tamaño de los folículos periféricos y/o centrales de los animales, después de una exposición única o repetidas a la radiación, es un hallazgo que coincide con el de otros autores, que describen hipotiroidismo e incremento folicular a expensas del coloide (Eşmekaya M.A. et col., 2010; Rajkovic V. et col., 2003), tanto en la

exposición de RF como ELF de 2-3 meses en animales. Este hallazgo va en consonancia con un estado de hipoactividad de la glándula comprobado en muchos estudios sobre función tiroidea tras exposición a CEM, en los que se han descrito los efectos funcionales e histológicos, como cambios en la secreción hormonal de T3 y T4 (Rajkovic V., 2003; Koyu A., 2005; Bergamaschi A., 2004) y alteraciones morfológicas que afectan al epitelio, tejido conectivo, células foliculares e interfoliculares y mastocitos (Rajkovic V., 2003; Rajkovic V., 2005; Rajkovic V., 2006). Este estado de inactividad transitorio en la glándula tiroidea de las ratas, causado por la radiación, desencadenaría una supresión en la eliminación o recambio de tiroglobulina en el coloide y un incremento compensatorio del diámetro folicular y/o hipotiroidismo (Suzuki K. et col., 2011). El incremento del tamaño de los folículos periféricos, en exposición aguda y/o repetida con frecuencia de 2,45 GHz, indica que la capacidad de penetración de la radiación constituye un estímulo en la glándula, que puede causar un daño, que si persistiese en el tiempo podría alterar la función, hecho descrito recientemente por otros autores (Eşmekaya M.A. et col., 2010; Rajkovic V. et col., 2003).

TIMO:

En el timo, al igual que en la glándula tiroidea, se presentan cambios morfológicos después de exposición aguda a CEM. En los escasos trabajos que hay sobre efectos de CEM sobre la estructura del timo, se describen alteraciones que van desde cambios en el ADN a la involución y atrofia de la glándula (Quagliano D. et col., 2000, 2004; Hekmat A. et col., 2013). A partir de los estudios que realizamos con H-E en tejidos de timo de ratas radiadas, encontramos aumento de glóbulos rojos extravasados, desde glóbulos rojos aislados a zonas de extensa hemorragia, aumento del número de vasos en la medular y de células retículoepiteliales de aspecto hemorrágico. Estos hallazgos están en relación con el aumento proporcional de SAR. Y nos demuestran que la radiación no ionizante provoca una respuesta celular de forma aguda y además un efecto inmediato en la morfología microscópica con aumento de la permeabilidad del endotelio vascular, acompañado por un aumento del flujo vascular y del número de vasos por efecto de la radiación. El timo tiene un importante papel en el sistema inmunitario y puede ser modulado por agentes ambientales como los campos electromagnéticos. Así, en los últimos años se ha descrito a nivel experimental que los campos electromagnéticos

actúan en el timo de mamíferos, pudiendo interferir en su involución y en la muerte celular (Quaglino D. et col., 2000, 2004) provocando daño en el ADN (Hekmat A. et col., 2013). También provoca efectos inmunitarios como incrementar la activación fagocítica, la producción de interleukina de los macrófagos (Frahm J. et col., 2006) así como el efecto inmunosupresor y la reducción de células Natural-Killer en ratas preñadas a 0,6 W/cm² (Hiroyuki N. et col., 2003) causados por la exposición a campos electromagnéticos a baja y alta frecuencia, en animales de experimentación.

En base a estos resultados podemos decir que las HSPs y sobre todo la Hsp90 puede resultar un buen biomarcador de respuesta celular en los cambios morfológicos del tiroides y del timo al estrés inducido por la radiación con microondas.

En el futuro sería necesario determinar la existencia de una correlación de efectividad terapéutica y un umbral tóxico, tanto en tiroides como en timo.







6. CONCLUSIONES



- 1.- En esta tesis hemos conseguido un modelo animal para el estudio de efectos subtérmicos, por exposición a microondas, mediante la puesta a punto de un sistema experimental de radiación en una cámara GTEM.
- 2.- La exposición a la radiación con microondas de ratas Sprague-Dawley en una cámara GTEM con frecuencia de 2,45 GHz, ha demostrado que la glándula tiroides es sensible, tanto en exposición aguda como repetida, para niveles de SAR subtérmicos.
- 3.- La radiación controlada durante 30 minutos, con niveles de SAR subtérmicos, de los animales expuestos en la cámara GTEM, expresan valores de Hsp90 y Hsp70 que determinan niveles de estrés celular en la glándula tiroides y en timo.
- 4.- Las glándulas tiroides de ratas expuestas a radiación microondas de 2,45 GHz, mostraron un descenso en las proteínas de estrés celular térmico, Hsp90 y Hsp70, de forma transitoria por mecanismos no térmicos.
- 5.- La glándula tiroides se mostró más sensible a radiación microondas con potencias de 3 W para los niveles de proteína Hsp90.
- 6.- La exposición a radiación con microondas, en la glándula tiroides, bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente, no mostró signos de lesión ni de apoptosis en la estructura glandular que indique un daño incipiente, causado por la radiación no ionizante.
- 7.- La exposición aguda/ repetida de la glándula tiroides a 2,45 GHz en el modelo experimental de diatermia a niveles subtérmicos en ratas, provoca cambios morfológicos visibles:
 - A) Una hipertrofia glandular en relación al SAR y/o el número de exposiciones.
 - B) Una modificación de la distribución de la proteína Hsp90 asociada a las membranas y las células parafoliculares.

Estos efectos pueden no ser exclusivos o directamente producidos por la radiación, añadiéndose efectos indirectos del hipotálamo

6. CONCLUSIONES

- 8.- La exposición a la radiación a 2,45 GHz de animales pequeños ha demostrado que el timo también es vulnerable, a niveles de SAR subtérmicos. La radiación causó un descenso transitorio de los valores de la proteína Hsp90, que determinó los niveles de estrés celular en el timo, por mecanismos no térmicos. No aparecieron modificaciones apreciables de los niveles de Hsp70 en el timo.
- 9.- La recuperación de los niveles basales de la proteína Hsp90, en el timo, fue más tardía para potencias de 3 W. Al igual que en tiroides, a esta potencia la glándula se mostró más resistente a su recuperación a niveles basales, después de transcurridas 24 horas de la exposición a radiación no ionizante.
- 10.- El estudio combinado de los niveles de proteínas de estrés térmico (Hsp90 y Hsp70) y los cambios morfológicos que han tenido lugar en el tejido tímico, por efecto de la radiofrecuencia a 2,45 GHz con niveles de SAR subtérmicos, nos han permitido determinar que:
 - a) La radiación no ionizante, a niveles subtérmicos, constituye un agente modulador de la proteína Hsp90 pero no de la Hsp70, tanto de forma cuantitativa como cualitativa en el tejido tímico.
 - b) Hay una relación directa entre la intensidad aplicada de SAR en la radiación y el estrés causado al animal, medido por temperatura rectal, así como los signos tisulares que están en relación con un incremento de la permeabilidad endotelial y de la vascularización en el timo.
- 11.- En función de los cambios encontrados en la morfología y en la estructura celular de la glándula tiroides y del timo sería necesario realizar más estudios en ambos tejidos que determinen el umbral entre los efectos beneficiosos y tóxicos para poder establecer un balance terapéutico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





- Adair E.R.**, Black D.R. (2003). Thermoregulatory responses to RF energy absorption. *Bioelectromagnetics*. Suppl 6:S17-38.
- Adair R.K.** (2003). Biophysical limits on athermal effects of RF and microwave radiation. *Bioelectromagnetics*. 24(1): 39-48.
- Albi E.**, Curcio F., Spelat R., Lazzarini A., Lazzarini R., Cataldi S., Loreti E., Ferri I., Ambesi-Impiombato F.S. (2012). Loss of parafollicular cells during gravitational changes (microgravity, hypergravity) and the secret effect of pleiotrophin. *PLoS One*. 2012;7(12):e48518.
- Alfieri R.R.**, Bonelli MA., Pedrazzi G., Desenzani S., Ghillani M., Fumarola C., Ghibelli L., Borghetti AF., Petronini PG. (2006). Increased levels of inducible HSP-70 in cells exposed to electromagnetic fields. *Radiat Res*. 165(1): 95-104.
- Antonio C.**, Deam R.T., (2007). Can “microwave effects” be explained by enhanced diffusion?. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 9: 2976-2982.
- Aydin C.**, Grace C.E., Gordon C.J. (2011). Effect of physical restraint on the limits of thermoregulation in telemetered rats. *Exp Physiol*. Nov; 96(11):1218-27. 2011.
- Bagatell R.** y Whitesell L. (2004). Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 3(8) Minireview.
- Banik, S.**, Bandyopadhyay S., Ganguly S. (2003). Bioeffects of microwaves-a brief review. *Bioresource Technology*. 87(2): 155-159.
- Baryshev M.**, Kim PS., Yoo SE., Vono J., Targovnik HM., Camargo R., Hossain SA., Arvan P. (1996). Congenital hypothyroid goiter with deficient thyroglobulin. Identification of an endoplasmic reticulum storage disease with induction of molecular chaperones. *J.Clin Invest*. 15 98(12): 2838-44.
- Baryshev M.**, Sargsyan E., Wallin G., Lejniaks A., Furudate S., Hishinuma A., Mkrtchian S., (2004). Unfolded protein response is involved in the pathology of human congenital hypothyroid goiter and rat non-goitrous congenital hypothyroidism. *J Mol Endocrinol*. 32(3): 903-20.
- Becker J.**, Craig E.A. (1994). Heat shock proteins as molecular chaperones. *Biochem*. 219: 11-23.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergamaschi A., Magrini A., Ales G., Coppeta L., Somma G. (2004). Are thyroid dysfunctions related to stress or microwave exposure (900 MHz)? *Int J Immunopathol Pharmacol.* 17 (2 Suppl), 31-6.

Bogolyubov V.M., Zubkova S.M., Frenkel I.D., Sokolova Z.A., Laprun I.B. (1988). The functional state of thymus cells following microwave exposure of endocrine glands. *Radiat Res.* Jul; 115(1): 44-53.

Boletín Oficial de la Unión Europea, de 20 de octubre 2010, L 276/33. Directiva Europea 2010/63/ UE. publicada en el <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079>.

Boltze C., Schneider-Stock R., Roessner A., Quednow C., Hoang-Vu C. (2003). Function of HSP90 and p23 in the telomerase complex of thyroid tumors. *Pathol Res Pract.* 199(9): 573-9.

Bowers S.L., Bilbo S.T., Dhabhar F.S., Nelson R.J. (2008). Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 22 105–113.

Brescia F., Sarti M., Massa R., Calabrese M.L., Sannio A., Scarfi M.R. (2009). Reactive oxygen species formation is not enhanced by exposure to UMTS 1950 MHz radiation and co-exposure to ferrous ions in Jurkat cells. *Bioelectromagnetics.* 30(7):525-35.

Brown M.A., Zhu L., Schmidt C., Tucker P. (2007). Hsp90 From signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 363(2): 241-246.

Cairo P., Greenebaum B., Goodman E. (1998). Magnetic field exposure enhances mRNA expression of σ^{32} in *E. coli*. *Journal of Cellular Biochemistry* 68 (1): 1–7.

Calini V., Urani C., Camatini M. (2003). Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicol In Vitro.* 17(5-6): 561-6.

Caraglia M., Marra M., Mancinelli F., D'Ambrosio G., Massa R., Giordano A., Budillon A., Abbruzzese A., Bismuto E. (2005). Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *J Cell Physiol.* 204(2): 539-48.

Carper S.W., Duffy J.J., Gerner E.W. (1987). Heat shock proteins in thermotolerance and other cell processes. *Cancer research.* 47: 5249-5255.

- Casanueva F.**, Vázquez J.A. (1995). *Endocrinología clínica*. ISBN: 84-7978-203-X.
- Challis, L.J.** (2005). Mechanisms for interaction between RF fields and biological tissues. *Bioelectromagnetics* supplement 7: S98-S106.
- 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.L.**, Cai L., Meng Q.Y., Xu S., Wan H., Liu S.Z. (2000). Low-dose whole-body irradiation (LD-WBI) changes protein expression of mouse thymocytes: effect of a LD-WBI-enhanced protein RIP10 on cell proliferation and spontaneous or radiation-induced thymocyte apoptosis. *Toxicol Sci.* 55(1):97-106.
- Chow K.**, Tung WL. (2000). Magnetic field exposure enhances DNA repair through the induction of DnaK/J synthesis. *FEBS Lett.* Jul 28; 478(1-2): 133-6.
- Csermeley P.**, Schnaider T., Soti C, Prohászka Z., Nardai G.(1998). The 90 Kda molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. *Pharmacol.Ther.* 79: 129-68.
- Conde-Agudelo A.**, Papageorghiou A.T., Kennedy S.H., Villar J. (2013). Novel biomarkers for predicting intrauterine growth restriction: a systematic review and meta-analysis. *An International Journal of Obstetrics and Gynecology.* 681-694.
- Crofton K.M.**, Craft E.S., Hedge J.M., Gennings C., Simmons J.E., Carchman R.A., Carter W.H. Jr., DeVito M.J. (2005). Thyroid-hormone-disrupting chemicals: evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environ Health Perspect.* 113(11): 1549-54
- Cui Y.**, Ge Z., Rizak J.D., Zhai C., Gong S., Che Y. (2012). Deficits in water maze performance and oxidative stress in the hippocampus and striatum induced by extremely low frequency magnetic field exposure. *PLoS One*; 7(5):e32196.
- Curcio G.**, Ferrara M., Moroni F., D'Inzeo G., Bertini M., De Gennaro L. (2005). Is the brain influenced by a phone call?: an EEG study of resting wakefulness. *Neurosci. Res.* 53, 265–270.
- D'Andrea, J.A.**, Ziriach J.M., Adair E.R. (2007). Radiofrequency electromagnetic fields: Mild hyperthermia and safety standars. *Progress in Brain research.* 162: 107-135.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Daniells C., Duce I, Thomas D, Sewell P, Tattersall J, de Pomerai D. (1997). Transgenic nematodes as biomonitors of microwave-induced stress. *Mutat Research*. 13; 399(1): 55-64.

Dawe, A.S., Smith B., Thomas DWP., 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 Bruyn L., de Jager L. (1994). Electric field exposure and evidence of stress in mice. *Environ Res*; 65:149– 60.

de Iuliis G.N., Newey R.J., King B.V., Aitken R.J. (2009). Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One*. Jul 31; 4(7).

de Pomerai D., Smith B., Dawe A., North K., Smith T., Archer DB., Duce IR., Jones D., Candido EP, (2003). Microwave radiation can alter protein conformation without bulk heating. *FEBS Lett*. 543 (1-3): 93-7.

Dewhirst M.W., Vigliant B.L., Lora-Michieli 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.

Diario Oficial de la Unión Europea, de 24 de mayo de 2004, L 184/1. Directiva Europea 2004/40/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004,

Di Carlo A., White, N., Guo F., Garret P., Litovitz T. (2002). Chronic Electromagnetic Field Decrease HSP70 Levels and Lowers Cytoprotection. *Journal of Cellular Biochemistry* 84 (3): 447-454.

Dominguez-Gerpe L. y Rey-Méndez M. (2003). Evolution of the Thymus Size in Response to Physiological and Random Events Throughout Life. *Microscopy Research and Technique*, 62:464–476.

D'Souza S.M., Brown I.R. (1998). Constitutive expression of heat shock proteins Hsp90, Hsc70, Hsp70 and Hsp60 in neural and non-neural tissues of the rat during postnatal development. *Cell Stress and Chaperones*. 3(3): 188-199.

Duffy B.J. y Fitzgerald P., (1950). Thyroid cancer in childhood and adolescence. Report of 28 cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 10: 1296-1308.

Eşmekaya M.A., Seyhan N., Ömeroğlu S., (2010). Pulse modulated 900 MHz radiation induces hypothyroidism and apoptosis in thyroid cells: a light, electron microscopy and immunohistochemical study. *Int J Radiat Biol.* 86(12): 1106-16.

Feige U., Morimoto R.I., Yahara I., Polla B.S. (1996). Stress Inducible Cellular Responses. Birkhäuser-Verlag, Basel-Boston-Berlin

Foster K.R., Schawn, H.P. (1996). Dielectric properties of tissues. Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, 2nded.

Frahm J., Lantow M., Lupke M., Weiss D.G., Simko M. (2006). Alteration in Cellular Functions in Mouse Macrophages After Exposure to 50 Hz Magnetic Fields. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:168–177.

French P.W., Penny R., Laurence J.A., Mckenzie D.R. (2000). Mobile phones, heat shock proteins and cancer. *Differentiation.* 67(4-5): 93-7.

Gapeyev A.B., Mikhailik, E.N. y Chemeris. N.K. (2008). Anti-Inflammatory Effects of Low-Intensity Extremely High-Frequency Electromagnetic Radiation: Frequency and Power Dependence. *Bioelectromagnetics*, 29:197-206

Gustman-Conrad A., Heydair A.R., You S., Richardson A. (1998). The expression of heat shock protein HSP-70 decreases with cellular senescence in vitro and in cells derived from young and old human subjects. *Exp Cell Resch.* 241: 404-13.

George I., Geddis M.S., Hana Lin Z.L., Gomez T., Blank Oz M.Z., Goodman R. (2008). Myocardial Function Improved by Electromagnetic Field Induction of Stress Protein hsp70. *J Cell Physiol.*, 216(3): 816–823

Gilbert M.E., Rovet J., Chen Z., Koibuchi N. (2012). Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. *NeuroToxicology* 33: 842–852.

Ginsberg J., Labeledz T., Brindley DN. (2006). Phosphorylation of heat shock protein-90 by TSH in FRTL-5 thyroid cells. *Thyroid.* 16(8): 737-42.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Goetz M.P., Toft D.O., Ames M.M., Erlichman D. (2003). The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Annals of oncology*. 14: 1169-1176.

Grad I., Picard, D. (2007). The glucocorticoid response are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275: 2-12.

Guiding principles for research involving animals and human beings.(2002). World Medical Association; American Physiological Society. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 283(2): R281-3.

Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra RK.,Chowdhuri DK. (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci*. 13, 86 (11-12): 377-84.

Gutiérrez-Mariscal M., Sánchez E., García-Vázquez A., Rebolledo-Solleiro D., Charli JL., Joseph-Bravo P.(2012). Acute response of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regulatory Peptides* 179: 61–70.

Guy, A.W., Lehmann J.F., Stonegridge J.B. (1974). Therapeutic applications of electromagnetic power. *Proceedings of the IEEE*. 62(1): 55-75.

Hartoft-Nielsen ML., Rasmussen Å. K,U. Feldt-Rasmussen U., Buschard K. and Bock T.(2005). Estimation of number of follicles, volume of colloid and inner follicular surface area in the thyroid gland of rats. *J.Anat*. 207, pp117–124.

Hekmat A., Saboury, Moosavi-Movahedi A. (2013). The toxic effects of mobile phone radiofrequency (940 MHz) on the structure of calf thymus DNA. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88:35–41.

Helmbrecht K., Zeise E., Rensing L. (2000). Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif*. 33(6): 341-65.

Hiroyuki N., Ichiyo M., Kotaro H. ,Yoshitaka N., Yasuhiro K., Keiki O. (2003). Non thermal effects of mobile phone frequency microwave on utero placental functions on pregnant rats. *Reproductive Toxicology* 17: 321–326.

ICNIRP. (1998). “International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection”. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up 300 GHz). *Health Physics*. 74: 994-520.

Jarosz D.F., Lindquist S. (2010). Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation *Science*. 330(6012): 1820-4.

Jiang D.P., Li J., Zhang J., Xu S.L., Kuang F., Lang H.Y., Wang Y.F., An G.Z., Li J.H., Guo G.Z. (2013). Electromagnetic pulse exposure induces overexpression of Beta amyloid protein in rats. *Arch Med Res*. Apr; 44(3): 178-84.

Jin Y.B., Lee H.J., Seon J., Pack J.K., Kim N., Lee Y.S. (2011). One-year, simultaneous combined exposure of CDMA and WCDMA radiofrequency electromagnetic fields to rats. *Int J Radiat Biol*. Apr; 87(4):416-23.

Joly A.L., Wettstein G., Mignot G., Ghiringhelli F., Garrido G. (2010). Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun*. 2(3): 238-47.

Jorge-Mora T., Alvarez- Folgueiras M., Leiro J., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López Martín E. (2010). Exposure to 2,45 GHz microwave radiation provokes cerebral changes in induction of HSP-90 α/β in rat. *PIER (Progress in Electromagnetic Research)*. 100: 351-379.

Jorge-Mora T., Misa-Agustiño M.J., Rodríguez-González J.A., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. (2011). 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*. 36(12): 2322-32.

Jugan M.L., Levi Y., Blondeau JP. (2010). Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. *Biochem Pharmacol*. 79 (7): 939-47.

Kalmar B., Greensmith L. (2009). Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev*. 61 (4): 310-8.

Kang K.I., Bouchedone I., Fortin D., Bauline E.E., Cattelline M.G. (1998). Luciferase activity synthesis of HSP-70 and HSP90 are insensitive to 50 HZ electromagnetic fields. *Life Science*. 63(6): 489-497.

Kang C.M., Park K.P., Cho C.K., Seo J.S., Park W.Y., Lee S.J., Lee Y.S. (2002). Hspa4 (HSP70) is Involved in the Radioadaptive Response: Results from Mouse Splenocytes. *Radiation Research* 157(6): 650-655.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Karasek M., Woldanska-Okonska M. (2004). Electromagnetic fields and human endocrine system. *The Scientific World Journal*. 4 Suppl 2: 23-8.

Karownik-Lewińska M. y Kokoszko-Bilska A. (2012). Oxidative damage to macromolecules in the thyroid - experimental evidence. *Thyroid Research*, 5:25.

Katschinski, D.M. (2004). On heat and cells and proteins. *New Phisilo Sci.*, 19: 11-15.

Kieran D., Kalmar B., Dick J. R., Riddoch-Contreras J., Burnstock G., Greensmith L. (2004). Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice. *Nat. Med.* 10, 402–405.

Kindás-Mügge I., Knobler RM., Hönigsmann H. (1996). Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B*. 35(3): 141-8. Review.

Kiray A., Tayefi H., Kiray M., Bagriyanik H.A., Pekcetin C., Ergur B.U., Ozogul C. (2013). The effects of exposure to electromagnetic field on rat myocardium. *Toxicol Ind Health*. Jun; 29(5):418-25.

Kmieć Z., Kotlarz G., Smiechowska B., Myśliwski A. (1998). The effect of fasting and refeeding on thyroid follicle structure and thyroid hormone levels in young and old rats. *Arch Gerontol Geriatr*. 26 (2): 161-75.

Kostoff R.N., Clifford G.Y. Lau. (2013). Combined biological and health effects of electromagnetic fields and other agents in the published literature. *Technological Forecasting & Social Change*.

Koyu A., Cesur G., Ozguner F., Akdogan M., Mollaoglu H., Ozen S. (2005). Effects of 900 MHz electromagnetic field on TSH and thyroid hormones in rats. *Toxicology Letters* 175(3): 257-62.

Kregel K.C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 92(5): 2177-86.

Kwee S. (2004). Generation of Heat shock proteins by EMF. Institute of Medical Biochemistry Denmark, Helsinki 2004. AARHUS UNIVERSITY.

Lanneau D., de Thonel A., Maurel S., Didelot C. (2007). Apoptosis versus cell differentiation: role of heat shock proteins HSP-90, HSP-70 and HSP27. *Prion*. 1 (1): 53-60.

- Laurence J.A.**, French P.W., Lindner R.A., Mckenzie D.R. (2000). Biological effects of electromagnetic field-mechanisms for the effects of pulsed microwave radiation on protein conformation. *J Theor. Biol.* 206: 291-298.
- Lee S.**, Johnson D., Dunbar K., Dong H., Ge X., Kim YC., Wing C., Jayathilaka N., Emmanuel N., Zhou CQ., Gerber HL., Tseng HL., Wang SM. (2005). 2.45 GHz radiofrequency fields alter gene expression in cultured human cells. *FEBS Lett.* 579(21): 4829-36.
- Lehmann J.F.**, de Lauter, B.J. (1993). Capítulo 13. Diatermia y terapéutica superficial con calor, láser y frío. Krusen. Medicina física y Rehabilitación. 4ª edición. Editorial médica panamericana. Madrid. 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.** (1953). The biophysical basis of biologic ultrasonic reactions with special reference to ultrasonic therapy. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.* 34: 139-152.
- Lin T.N.**, Chen J.J., Wang S.J., Cheng J.T., Chi S.I., Shyu A.B., Sun G.Y., Hsu C.Y. (1996). Expression of NGFI-B mRNA in a rat focal cerebral ischemia-reperfusion model. *Brain Res Mol Brain Res.* Dec 31; 43(1-2):149-56.
- Lindquist S.** y Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Liu T.**, He W.L., Ye K. (2008). Anxiogenic effect of chronic exposure to extremely low frequency magnetic field in adult rats, *Neurosci. Lett.* 434 12-17.
- Lope V.**, Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., López-Abente, G., Gustavsson, P., Floderus, B., Dosemeci, M., Silva, A. and Pollán, M.(2006). Occupational exposure to ionizing radiation and electromagnetic fields in relation to the risk of thyroid cancer in Sweden. *Scand. J. Work Environ. Health* 32, 276-284.
- López-Martín, E.**, Relova-Quintero J.L., Gallego-Gómez R., Peleteiro-Fernández M., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J. (2006). GSM radiation triggers seizures and increase cerebral c-Fos positivity in rats pretreated with subconvulsive doses of picrotoxin. *Neuroscience letters* 398 (1-2), 139-44.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

López-Martín, E., Bregains J.C., Jorge-Barreiro FJ., Sebastian-Franco JL., Moreno-Piquero E., Ares-Pena F. (2008). 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. PIER* 87, 149-165.

López-Martín, E., Bregains J.C., Relova-Quintero J.L. Jorge-Barreiro FJ., Ares-Pena F. (2009). Pulse-Modulated GSM Radiation Triggers Changes in brain Activity and in c-Fos Expression in Cortical and Subcortical Areas After Subconvulsive Doses of Picrotoxin. *Journal of Neurosciencie Research.* 87(6), 1484-14.

Lu Y.S., Huang B.T., Huang Y.X. (2012). Reactive oxygen species formation and apoptosis in human peripheral blood mononuclear cell induced by 900 MHz mobile phone radiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:740280.

Lyn Patrick N.D. (2009). Thyroid Disruption: Mechanisms and Clinical Implications in Human Health. *Alternative Medicine Review.* Volume 14, Number 4.

Lu S.T., Lebda N.A., Pettit S., Michaelson S.M. (1985). The relationship of decreased serum thyrotropin and increased colonic temperature in rats exposed to microwaves. *Radiat Res.* Dec; 104(3):365-86.

Magin R.L., Lu S-T., Michaelson S.M. (1977). Microwave Heating Effect on the Dog Thyroid Gland. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering*, Vol BME-24, N° 6, November 1977.

Magin R.L., Lu S., Michaelson S.M. (1977). Stimulation of dog thyroid by local application of high intensity microwaves. *Am J Physiol.* Nov; 233(5):E363-8.

Malyapa R.S., Ahern E.W., Bi C., Straube W.L., LaRegina M., Pickard W.F., Roti Roti J.L. (1998). DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. *Radiat Res.* 1998 149(6): 637-45.

Marshall I., Karaszewski B., Wardlaw J.M., Cvorov V., Wartolowska K., Armitage P.A., Carpenter T., Bastin M.T., 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.

Martín-Lacave I., Borrero M.J., Utrilla J.C., Fernández-Santos J.M., de Miguel M., Morillo J., Guerrero J.M., García-Marín R., Conde E.(2009). C cells evolve at the same rhythm as follicular cells when thyroidal status changes in rats. *J Anat* 214: 301–309.

Martínez A. (2004). Tesis Doctoral. “Estudio y desarrollo de técnicas de evaluación de dosimetría electromagnética y de niveles de exposición a emisiones radioeléctricas”.

Mason J.W. (1968). Organization of the multiple endocrine responses to avoidance in the monkey. *Psychosom Med.* Sep-Oct; 30(5): Suppl: 774-90.

McIntosh L.J., Sapolsky R.M. (1996). Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 17 (3-4):873-82.

Medeiros-Neto G., Kim PS, Yoo SE, Vono J, Targovnik HM, Camargo R, Hossain SA, Arvan P. (1996). Congenital hypothyroid goiter with deficient thyroglobulin. Identification of an endoplasmic reticulum storage disease with induction of molecular chaperones. *J Clin Invest.* Dec 15; 98 (12):2838-44.

Miliham S., Morgan L. (2008). A new electromagnetic exposure metric: High frequency transients associate with increased cancer incidence in teachers in California school. *American Journal of Industrial Medicine,* 51(8): 579-586.

Millar, N.I., Wei A.Q., Molloy T.J., Bonar F., Murrell G.AC. (2008). Heat shock protein and apoptosis in supraespinosus tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res.* 466: 1569-1576.

Misa Agustiño M.J., Leiro J.M., Jorge Mora M.T., Rodríguez-González J.A., Jorge Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. (2012). 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.* Sep 15;1(9): 831-8.

Mortavazi S., Habib A., Ganj-Karami A., Samimi-Doost R., Pour-Abedi A., Babaie A. (2009). Alterations in TSH and Thyroid hormones following mobile phone use. *Oman Medical Journal.* 24(4):274-8.

Morimoto R.I. (1993). Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science.* Mar 5; 259 (5100):1409-10.

Morimoto R.I., Sarge K.D., Abravaya K. (1992). Transcriptional regulation of heat shock genes. *J. Biol. Chem.* Nov 5; 267(31): 21987-90.

Morimoto R., Santoro M.G. (1998). Stress-inducible responses and heat shock protein: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotechnology,* 16 (9), 833–838.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Moseley P. (2000). Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. Jul 25 ; 48 (3) : 299-302.

Mostafa R.M., Mostafa Y.M., Ennaceur A. (2002). Effects of exposure to extremely low-frequency magnetic field of 2 G intensity on memory and corticosterone level in rats. *Physiology & Behavior*.76 589– 595.

Navakatikian M.A., Gordienko V.M., Slavnov V.N., Nogachevskaja S.I., Tomashevskaja L.A. (1990). The effect of microwave irradiation on the status of the thyroid gland. *Radiobiologiya*. Sep-Oct; 30(5):679-84.

Nort Van J.M. (2008). Stress proteins in CNS inflammation. *Journal of Pathology*. 214: 267-27.

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. *Neurosci Behav Physiol* 38:415–420.

Novoselova E.G., Glushkova O.V., Cherenkov D.A., Chudnovsky V.M.(2006). Fesenko EE. Effects of low-power laser radiation on mice immunity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*; 22: 33–38

Ogura, Y., Naito H., Tsurukawa, T., Ichinoseki-Sekini, N., Saga N., Sugiura T., Katamoto S. (2007). Microwave Hyperthermia treatment increases heat shock proteins in musculoskeletal muscle. *Br J Sports Med*. 41 (7): 453-5.

Ohye H., Sugawara M.(2010). Dual oxidase, hydrogen peroxide and thyroid diseases. *Exp Biol Med* (Maywood). 235(4): 424-33.

Paggi A., Di Prima M.A., Paparo B.S., Pellegrino C., Faralli A.R., Sinopoli M.T., Leri O. (1995). Anti HSP-70 k Da heat shock protein antibodies in sera of patients affected by autoimmune and non-autoimmune thyroid diseases. *Endocr Res*. 21(3): 555-67.

Parcellier A., Burbuxani S., Schmitt E., Solary E., Garrido C. (2003). Heat shock proteins cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 304: 505-512.

Pardue S., Wang S., Miller M.M., Morrison-Bogord.M. (2007). Elevated levels of inducible heat shock HSP-70 proteins in human brain. *Neurobiology of aging*. 28: 314-324.

- Park J.W.**, Yeh M.W., Wong M.G., Lobo M., Hyun W.C., Duh Q.Y., Clark O.H. (2003). The heat shock protein 90-binding geldanamycin inhibits cancer cell proliferation, down-regulates oncoproteins, and inhibits epidermal growth factor-induced invasion in thyroid cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* Jul; 88(7): 3346-53.
- Paulraj R.**, Behari J. (2006). Protein kinase C activity in developing rat brain cells exposed to 2.45 GHz radiation. *Electromagn Biol Med.* 25(1): 61-70.
- 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.
- 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., Neirenberg 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.
- Picard D.** (2002). Heat shock protein 90, a chaperone for folding en regulation. *Cell Mol Life Sci.* 59: 1640-1648.
- Pieri C.**, Recchioni R, Moroni F. (1993). Age-dependent modifications of mitochondrial transmembrane potential and mass in rat splenic lymphocytes during proliferation. *Mech Ageing Dev.* 70:201-212.
- Pockley A.G.**, Muthana M, Calderwood SK. (2008). The dual immunoregulatory roles of stress proteins sends *Biochem Sci.* Feb; 33(2):71-9.
- Powers, M.V.**, Workman P. (2007). Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS Letter.* 581, pp.3758-3769.
- Quaglino D.**, Capri M., Ronchetti P. (2000). Modulation of Cell Death in the Rat Thymus Light and Electron Microscopic Investigations. *Annals New York Academy of Sciences.* 926:79-82.
- Quaglino D.**, Capri M., Zecca L., Franceschi C., Ronchetti IP. (2004). The Effect on Rat Thymocytes of the Simultaneous In Vivo Exposure to 50-Hz Electric and Magnetic Field and to Continuous Ligh. *Biological Effects of Electromagnetic Radiation The Scientific World JOURNAL* 4(S2), 91-99.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Rajdev S., Sharp FR. (2000). Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. *Toxicol Pathol.* 28(1): 105-12.

Rajkovic V., Matavulj M., Gledic D., Lazetic B. (2003). Evaluation of rat gland morphophysiological status after three months exposure to 50 Hz electromagnetic field. *Tissue&Cell.* 35: 223-231.

Rajkovic V., Matavulj M., Johansson O. (2005). Histological characteristic of cutaneous and thyroid mast cell populations in male rats exposed to power-frequency electromagnetic fields. *Int J Radiat Biol.* 81(7): 491-9.

Rajkovic V., Matavulj M., Johansson O. (2006). Light and electron microscopic study of the thyroid gland in rats exposed to power-frequency electromagnetic fields. *J Exp Biol.* Sep; 209(Pt 17):3322-8.

Ramaglia V., Buck L. T. (2004). Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of the anoxic western painted turtle. *J. Exp. Biol.* 207, 3775–3784.

Ratanachaiavong, S., Demaine A.G., Campbell R.D. y McGregor A.M. (1991). Heat shock protein 70 (Hsp70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 84: 48-52.

Real Decreto 1066/2001, de 28 de septiembre, publicado en el BOE núm. 234, sábado 29 de septiembre 2001, 36217.

Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, publicado en el BOE núm. 252, viernes 21 de octubre 2005, 34367.

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, publicado en el BOE núm. 34, viernes 8 de febrero de 2013, Sec. I pág. 11370.

Regel S.J., Achermann P. (2011). Cognitive Performance Measures in Bioelectromagnetic Research Critical Evaluation and Recommendations. *Environ Health.* Jan 25; 10(1):10.

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.

Rodina, A., Vilenchik M., Mooulik K., Aguirre J., Jim J. (2007). Selective compounds define Hsp90 as a major inhibitor of apoptosis in small-cell lung cancer. *Nature chemical Biology*, 3(8): 498-507.

Rosen, A., Stuchly, M.A. ; Vander Vorst, A. (2002). Applications of RF/microwaves in medicine. *IEEE Transactions on microwaves theory and techniques*, vol.50. nº 3, March.

Saddiki Traki F., Lescoat G., Maniey J. (1986). Effects of postnatal microwave exposure on thyrotropin level in the adult male rat. *J. Physiol (Paris)*. 81(1):3-6.

Samadi A., Loo P., Mukerji R., O'Donnell G., Tong X., Timmermann B.N., Cohen M.S. (2009). A novel HSP90 modulator with selective activity against thyroid cancers in vitro. *Surgery*. 146(6): 1196-207.

Samarketu S.P., Singh S.P. (1996). Effects of direct modulated microwave modulation frequencies exposure on physiology of cyanobacterium *Anabea dolilum*. *Asia Pacific Microwave Conference*, Vol. B.2.1 155-158.

Santin, A.P. y Furlanetto, T. W. (2011). Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *J. Thyroid Res*. 2011, 875125.

Schmid & Partner Engineering AG, Reference manual for the SEMCAD simulation platform for electromagnetic compatibility, antenna design and dosimetry, available from: 2009 <http://www.semcad.com>.

Schaffner Electrotest GmbH, GTEM Test Cells, Datasheet 2005.

Schmitt E., Gehrmann M., Brunet M., Multhoff G., Garrido C. (2006). Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*.81(1): 15-27.

Schroeder M.J., Sadasiva A., Nelson R.M.(2008). An analysis on the role of water content and state on effective permittivity using mixing formulas. *Biomechanics, Biomedical and Biophysical Engineering*, 2(1): 1-10.

Sebastian Franco J.L., Muñoz San-Martín, S., Sancho Ruiz M., y Miranda Pantoja J.M. (2006). Medición de radiaciones en seres vivos. *Investigación y Ciencia*. 46-55.

Shi B., Farboud B., Nuccitelli R., Isseroff R.R. (2003). Power-line frequency electromagnetic fields do not induce changes in phosphorylation, localization or expression of the 27-kilodalton heat shock protein in human keratinocytes. *Environ Health Perspect.* March; 111(3): 281–288.

Shore D.E., Carr C.E., Ruvkun G. (2012). Induction of Cytoprotective Pathways Is Central to the Extension of Lifespan Conferred by Multiple Longevity Pathways. *PLoS Genet.* July; 8(7): e1002792.

Sinha R.K. (2008). “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.

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”, *Ann Biomed Eng.*, vol, 36, no. 5, pp. 839-51.

Sreedhar A.S., Soti C., Csermely P. (2004). Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases. *Biochem Biophys Acta.* Mar 11; 1697(1-2): 233-42.

Sreedhar, A.S., Kalmar E., Csermely P., Shen Y-F. (2004). Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Letters*, 562: 11-15.

Sun X., Zhang W.H., Niu Y.J., Zeng M., Hou Y.C., (2004). Effects of microwave radiation on thymocytes in mice at different power densities. *Wang XR.Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.* Apr;22(2):108-11.

Suzuki K., Kawashima A., Yoshihara A., Akama T., Sue M., Yoshida A., Kimura H.J. (2011). Role of thyroglobulin on negative feedback autoregulation of thyroid follicular function and growth. *J Endocrinol.* 209(2): 169-74.

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.

Szemerszkya R., Zelenab D, Barnab I, Bárdosc I. (2010). Stress-related endocrinological and psychopathological effects of short- and long-term 50 Hz electromagnetic field exposure in rats. *Brain Research Bulletin.*81: 92–99.

Taylor D.M., Tradewell M.L., MinottiS., 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 HF1. *Cell Stress & Chaperones.* 12(2):151-162.

Tian F., Nakahara T., Wake K., Taki M., Miyakoshi J. (2002). Exposure to 2.45 Ghz electromagnetic fields induces HSP-70 at a high SAR of more than 20 W/kg but not 5W/kg in human glioma MO54 cells. *International Journal of Radiation Biology*. 78(5): 433-44.

Trautinger F., Kindás-Mügge I., Knobler RM., Hönigsmann H. (1996). Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B*. 35(3): 141-8.

Trautinger F., Wakeford R. (2004). The cancer epidemiology of radiation, *Oncogene*. 23: 6404-6428.

Tsurita G., Ueno S., Tsuno N.H., Nagawa H., Muto T. (1999). Effects of exposure to repetitive pulsed magnetic stimulation on cell proliferation and expression of heat shock protein 70 in normal and malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun*. Aug 11; 261(3): 689-94.

Usenko V.S., Lepekhin E.A., Lyzogubov V.V, Kornilovska I.N, Apostolov E.O, Tytarenko R.G, Witt M. (1999). The influence of maternal hypothyroidism and radioactive iodine on ratembryonal development: thyroid C-cells. *Anat Rec* 256: 7-13.

Valbonesi P., Franzellitti S., Piano A., Contin A., Biondi C., Fabbri E. (2008). Evaluation of HSP-70 expression and DNA damage in cells of a human trophoblast cell line exposed to 1.8 GHz amplitude-modulated radiofrequency fields. *Radiat Res*. 169(3): 2-9.

Vera A., Chong J.E., Leija L., Hernández Y., Marchal C. (2001). Hipertermia electromagnética, una alternativa para el tratamiento del cáncer: antecedentes, aspectos físicos y biológicos. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*. Vol. XXII, N° 2 Abril-septiembre.pp78-88.

Wallin G., Brönnegard M., Grimelius L., McGuire J., Orring T. (1992). Expression of thyroid hormone receptor, the oncogenes c-myc and H-ras, and the 90 kD shock protein in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *Thyroid*. 2(4): 307-13.

Wang J., Koyama S., Komatsubara 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 temperature measurements in rats: a comparison of microwave and ambient temperature exposures. *Bioelectromagnetics*. 7: 243-258.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Waza, M., Adachi H., Katsumo 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.

Weetman A.P., McGregor A.M. (1984). Autoimmune thyroid Disease: developments in our understanding. *Endocr. Rev.* 5: 309-353.

Welch W.J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews*, 72 (4), pp. 1063–1081.

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.

Wright, N.A. Borland R.G., Cookson J.H., Coward R.F., Davies J.A., Nicholson A.N., Christie J.L., Flanagan N.G, Goodridge V.D. (1984). Biological studies with continuous-wave radiofrequency (28 MHz) radiation. *Radiat Res.* Mar; 97 (3): 468-77.

Wright A., Sluka K. (2001). Non pharmacological treatment 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 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.

Yamashita H., Hata K., Yamaguchi H., Tsurita G., Wake K., Watanabe S., Taki M., Ueno S., Nagawa H. (2010). Short-term exposure to a 1439-MHz TDMA signal exerts no estrogenic effect in rats. *Bioelectromagnetics* 31, 573–575.

Yang S. H., Liu R., Wen Y., Perez E., Cutright J., Brun-Zinkernagel A. M., Singh M., Day A. L., Simpkins J. W.(2005). Neuroendocrine mechanism for tolerance to cerebral ischemia-reperfusion injury in male rats. *J. Neurobiol.* 62, 341–351.

Yang M., Zheng J., Yang Q., Yao H., Chen Y., Tan H., Jiang CH., Wang F., He M., Chen S., Wei Q., Tanguay R.M., Wu T. (2004). Frequency-specific association of antibodies against heat shock

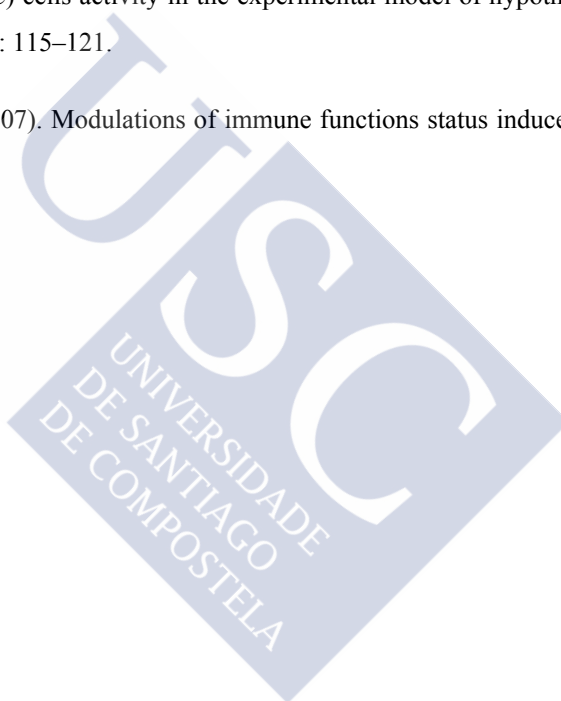
proteins 60 and 70 with noise induced hearing loss in Chinese workers. *Cell Stress & Chaperones*. 9 (2), 207–213.

Youde S.J. (1998). Stress protein expression in primary and immortalized cultures of human thyroid cells: a model system for study of stress proteins in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. *Cell Stress & Chaperones*. 3(2): 89-93.

Zaragoza, J.R. (1992). Física e instrumentación médicas. 2ª edición. Editorial Masson-Salvat Medicina. ISBN: 84-458-0017-5.

Zbucki R.L., Winnicka MM, Sawicki B, Szynaka B, Andrzejewska A, Puchalski Z.(2007). Alteration of parafollicular (C) cells activity in the experimental model of hypothyroidism in rats. *Folia Histochem Cytobiol*. 45: 115–121.

Zheng K.C., Ariizumi M.(2007). Modulations of immune functions status induced noise stress. *J Occup Health*, 49:32-38.







8. APENDICE: PUBLICACIONES



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

A) PUBLICACIONES EN REVISTAS:

- 1) Misa Agustiño M.J., Leiro J.M., Jorge Mora M.T., Rodríguez-González J.A., Jorge Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. 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 Sep 15;1(9):831-8.
- 2) Misa Agustiño M.J., Jorge Mora M.T., Jorge Barreiro F.J., Suárez-Quintanilla J., Moreno Piquero E., Ares-Pena F.J., López-Martín E. Acute single or repeated exposure to 2.45 GHz provokes changes in the morphology and expression of Hsp90 in rat thyroid. En revisión.
- 3) Misa Agustiño M.J., Leiro J.M., Jorge Mora M.T., Jorge Barreiro F.J., Salas Sánchez A., Ares-Pena F.J., López-Martín E. Electromagnetic fields at 2.45 GHz radiation cause changes in heat shock proteins Hsp90 and 70 and the morphology of the rat thymus. En revisión.

B) CONFERENCIAS INTERNACIONALES Y NACIONALES:

• **INTERNACIONALES:**

- 1) Misa Agustiño M.J., Leiro J.M., Jorge Mora M.T., Rodríguez-González J.A., Jorge Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. Experimental Analysis of HSP90 and 70 in-vivo Changes induced in the Thyroid by Exposure to Microwave Electromagnetic Fields, 1012. IEEE International Symposium on Antennas and Propagation and CNC/USNC/URSI Radio Science Meeting, version completa (2 páginas) en el CD-ROM con ISBN: 978-1-4673-0460-3, Chicago, USA, 8-14 julio 2012.
- 2) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora, M.T., Bregains, J., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Microwave frequency electromagnetic radiation at 2.450 MHz triggers effects in morphological expression on heat shock protein

90 (Hsp-90) in thymus of rats. Proceedings of 5th International Workshop on Biological Effects of EMFs. Palermo. September - October 2008. ISBN: 978-88-95813-03-05.

- 3) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora, C., Bregains, F.J., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Exposure of rat thyroid gland to 2.450 MHz microwave induces changes in expression of HSP-90. Proceedings of Biological Effects of Electromagnetic Fields, EMF (2). 4th International Workshop. Crete, Grece 16-20 October 2006. 1030-1034. ISBN: 960-233-173-9008.
- 4) 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. XV 4th European Congress of Physical and Rehabilitation Medicine. Madrid.

• **NACIONALES:**

- 1) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora M. T., Moreno Piquero E., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Efecto de la radiofrecuencia aguda y repetida a 2,45 GHz en la morfología de la glándula tiroides de rata. XXVIII Symposium nacional de la unión científica internacional de radio. Santiago de Compostela 11-13 de septiembre 2013. ISBN: 978-84-941537-1-6.
- 2) Misa-Agustiño, M.J., Alvarez-Folgueiras M., Jorge-Mora M. T., Jorge-Barreiro, F.J., Ares-Pena, F.J., Leiro J.M., López-Martín, E. Efecto de los campos electromagnéticos a 2,45 GHz sobre los niveles de proteínas de estrés Hsp90 y 70 en el tiroides de rata. II Congreso conjunto de SEFM y SEPM. XVII Congreso de la Sociedad Española de Física Médica (SEFM) y XIII de la Sociedad Española de Protección Radiológica (SEPM). Sevilla 10-13 mayo 2011.
- 3) Misa-Agustiño, M.J., Jorge-Mora M. T., Lage García S., Figueroa Rodríguez J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Estudio morfológico de la expresión de Hsp90 en la glándula tiroides en un modelo experimental de diatermia en ratas. XXIII Congreso de la Sociedad de Medicina Física y Rehabilitación. Santiago de Compostela noviembre 2005.

PARTICIPACIÓN EN PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y CONFERENCIAS INTERNACIONALES EN RELACIÓN AL TEMA DE ESTA TESIS:

A) PUBLICACIONES EN REVISTAS:

- 1) Jorge-Mora T., Misa-Agustiño M.J., Rodríguez-González J.A., Jorge-Barreiro F.J., Ares-Pena F.J., López-Martín E. 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.* 2011 Dec;36(12):2322-32.

B) CONFERENCIAS INTERNACIONALES Y NACIONALES:

• **INTERNACIONALES:**

- 1) Jorge-Mora, M.T., Bregains, J.C., Misa-Agustiño, M.J., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. (). C-Fos expression induced by microwave-frequency electromagnetic GTEM radiation at 2.450 MHz on anterior hypothalamus of rats. *Proceedings of 5th International Workshop on Biological Effects of EMFs.* Palermo, September - October 2008. ISBN: 978-88-95813-03-05.
- 2) Jorge-Mora, M.T., Misa-Agustiño, M.J., Bregains, J.C., Ares-Pena, F.J., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. 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).* 4th International Workshop. Crete, Greece 16-20 October 2006. 1030-1034. ISBN: 960-233-173-9008.
- 3) Jorge-Mora, M.T., Misa-Agustiño, M.J., Villamayor Blanco, B., Miguez-López, A., Jorge-Barreiro, F.J., López-Martín, E. Expression of heat shock protein 90 (HSP-90) on central nervous system (CNS) of control thermoregulation after microwave exposure of rats. *XV 4th European Congress of Physical and Rehabilitation Medicine.* Madrid 16-20 mayo 2006.

• **NACIONALES:**

- 1) Jorge-Mora T., Misa-Agustiño M.J., Jorge-Barreiro F.J., Rodríguez-González J.A., Ares-Pena F.J., López-Martín E. La radiofrecuencia aguda y repetida a 2,45 GHz provoca incremento de la expresión de C-FOS en el hipotálamo. XXVIII Symposium nacional de la unión científica internacional de radio. Santiago de Compostela 11-13 de septiembre 2013. ISBN: 978-84-941537-1-6.
- 2) Jorge-Mora T., Misa-Agustiño M.J., Jorge-Barreiro F.J., Rodríguez-González J.A., Ares-Pena F.J., López-Martín E. Estudio del SAR de radiación a 2,45 GHz en ratas en una cámara GTEM. Efectos en el control de la homeostasis cerebral. XVI Congreso de la sociedad Española de Física Médica y XII de la Sociedad Española de Protección Radiológica. Alicante 3-5 junio 2009.
- 3) Jorge-Mora T., Misa-Agustiño M.J., Villamayor Blanco B., Míguez López A., Jorge-Barreiro F.J., López-Martín E. Expresión de Hsp90 en el SNC en un modelo de diatermia experimental en ratas. XXIII Congreso de la Sociedad Gallega de Medicina Física y Rehabilitación. Santiago de Compostela noviembre 2005.