

LA RADIOFRECUENCIA AGUDA Y REPETIDA A 2,45 GHz PROVOCA INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE C-FOS EN EL HIPOTÁLAMO

M. T. Jorge Mora⁽¹⁾, M. J. Misa Agustino⁽²⁾, F. J. Jorge Barreiro^(2,4), J. A. Rodríguez González⁽³⁾, F. J. Ares Pena⁽³⁾, M. E. López Martín⁽⁴⁾
maria.teresa.jorge.mora@sergas.es, mari.misa@yahoo.es, fcojavier.jorge@usc.es, ja.rodriguez@usc.es, francisco.ares@usc.es, melena.lopez.martin@usc.es

⁽¹⁾ Servicio de Rehabilitación del Complejo Hospitalario Universitario de Pontevedra. Universidad de Vigo.
⁽²⁾ Servicio de Rehabilitación del CHUS, Complejo Hospitalario de la Universidad de Santiago de Compostela
⁽³⁾ Dpto. de Física Aplicada. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela.
⁽⁴⁾ Dpto. de Ciencias Morfológicas. Universidad de Santiago de Compostela. 15782, Santiago de Compostela.

Abstract- This study investigated the effects of microwave radiation on the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, extracted from rat brains. Expression of c-Fos was used to study the pattern of cellular activation in rats exposed once or repeatedly (ten times in 2 weeks) to 2.45 GHz radiation in a GTEM cell. The power intensities used were 3 and 12 W and the Finite Difference Time Domain calculation was used to determine the specific absorption rate (SAR). High SAR triggered an increase of the c-Fos marker 90 min or 24 h after radiation, and low SAR resulted in c-Fos counts higher than in control rats after 24 h. Repeated irradiation at 3 W increased cellular activation of PVN by more than 100% compared to animals subjected to acute irradiation and to repeated non-irradiated repeated session control animals. The results suggest that PVN is sensitive to 2.45 GHz microwave radiation at non-thermal SAR levels.

I. INTRODUCCIÓN

El núcleo paraventricular (PVN) situado en el hipotálamo anterior, es un centro regulador para la homeostasis y es el núcleo más importante en relación al circuito del sistema nervioso que actúa en el estrés [1].

Los genes inmediatos tempranos (IEG) son poderosas herramientas para identificar la activación de las neuronas [2]. El sistema nervioso central es sensible a la acción de los campos electromagnéticos [3] y provoca cambios en la expresión de c-fos gene por ultra alta frecuencia (UHF) [4], extremadamente alta frecuencia (EHF) [5] y niveles de radiofrecuencia (RFR) que inducen estrés térmico [6].

Nosotros llevamos a cabo un análisis comparativo de los efectos de activación celular en el núcleo PVN de las ratas, producido por campos electromagnéticos no pulsados a 2.450 MHz a diferentes niveles de potencia (3 ó 12 vatios) durante 30 minutos con exposición única o repetida en 2 semanas a 3 vatios en una cavidad experimental GTEM.

El SAR es previamente obtenido utilizando la técnica de diferencias finitas en el dominio temporal mediante software. La monitorización del SAR junto con los resultados morfológicos obtenidos de la inmunohistoquímica de la proteína de c-Fos en diferentes regiones del núcleo paraventricular de los cerebros postmortem determinará la

respuesta del núcleo hipotalámico al efecto de la radiación no ionizante.

II. METODOLOGÍA

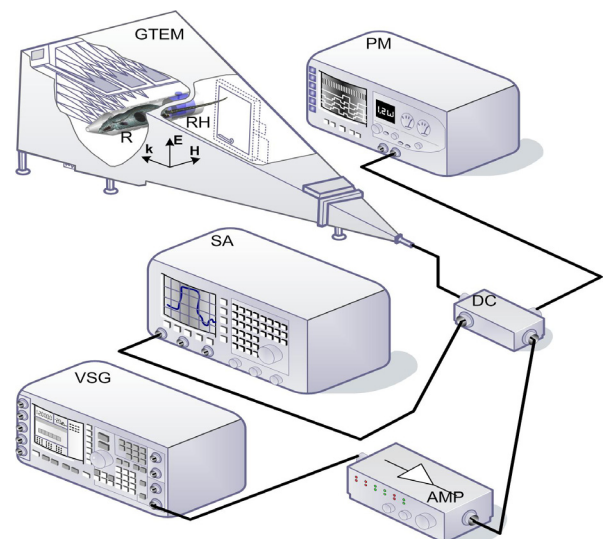


Fig. 1. Esquema del sistema de radiación microonda utilizado. GTEM: Cámara GTEM Schaffner 250; GSV Generador Vectorial de Señales Agilent E4438C (250 KHz-4 GHz); AMP: Amplificador Aethercomm 0.8-3.2-10; Acoplador Direccional NARDA 3282B-30 (800-4000 MHz); AE: Analizador de Espectro Aligent E4407B (9KHZ-26,5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

A. Radiación con microondas en la cavidad experimental (GTEM). Cálculo de SAR.

1. A Descripción del sistema experimental de radiación

Una vez introducidos los animales en un cepo de metacrilato de tamaño 23 x 6 cm en su parte más ancha y 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.

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

de 2450 MHz regulada a la potencia requerida durante la irradiación. La salida procedente del AMP se conecta al Acoplador Direccional AD para pasar directamente a la Cámara de Radiación GTEM en donde se encuentra la rata R irradiada, convenientemente posicionada en la zona de máxima uniformidad de campo (catálogo de Schaffner) e inmovilizada mediante un cepo de metacrilato (CR). El AD permite medir los valores de potencia incidente P_{IN} y reflejada P_{REF} , monitorizando el valor de la primera, mediante el Analizador de Espectros AE y obteniendo el valor de la segunda con el Medidor de Potencia (MP). Se observa que el campo incide sobre R en la dirección \mathbf{k} con los vectores \mathbf{E} y \mathbf{H} posicionados perpendicular y paralelamente al eje principal de \mathbf{R} , respectivamente. Consecuentemente, a la zona izquierda de R recibe la máxima amplitud de campo, produciendo apantallamiento en la zona derecha.

Puesto que el campo no es completamente uniforme en dicha región, su módulo se estima por el valor medio incidente sobre R, calculado mediante la expresión:

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

siendo h la altura de la bóveda (*septum*) en la zona de exposición (posición de la CR), ver Fig. 1, P_{IN} la potencia de entrada en la GTEM (potencia incidente), $Z_0=50$ [Ω] la impedancia de entrada de la GTEM, y ζ un coeficiente que depende del Rizado del campo dentro de la zona de posicionamiento de CR, considerado igual a 2 [catálogo de Schaffner]. El valor de E obtenido durante la experimentación de acuerdo a la P_{IN} utilizada se presenta en la sección correspondiente a los resultados.

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

Los valores de SAR se han estimado, en este experimento, con la ayuda del SEMCAD X. Para ello, se utilizó un modelo numérico de rata Sprague-Dawley de 198,3 g, obtenido a partir de 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 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.

La zona izquierda de R recibe la máxima amplitud de campo, produciendo apantallamiento en la zona derecha. Puesto que el campo no es completamente uniforme en dicha región, su módulo se estima por el valor medio incidente sobre R, calculado mediante la expresión:

$$SAR_E = SAR_S \times W_S / W_E$$

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.

B. Diseño experimental

Se utilizaron un total de 60 ratas hembras Sprague – Dawley de un peso aproximado de 230-250 gr. Para su

estudio se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo A: (N=20) Animales con una exposición aguda de radiación y estudiados 90 minutos después de la radiación.
- Grupo B: (N=20) Animales con una exposición aguda de radiación y estudiadas 24 horas después de la radiación.
- Grupo C: (N=20) Animales son exposiciones repetidas una cada día durante 5 días a la semana y un total de 10 exposiciones.

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

C. Procesamiento del tejido y estudios de Inmunohistoquímica.

Se realiza tras exponer a los animales en la cámara los 30m de radiación y esperar para su sacrificio 90 minutos.

Una vez que se anestesiaron a los animales profundamente con pentotal (mirar dosis) se perfundieron transcárdialmente vía aorta ascendente, primero con salino al 0,9% y paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M de pH 7,4. Se extrajeron los cerebros, se crioprotegieron y finalmente se cortaron en secciones de 40 micras en un micrótopo de congelación.

Técnica de Inmunohistoquímica: las secciones se sometieron a un periodo de preincubación de una hora en suero normal de la misma especie del animal de la que obtuvo el secundario (de caballo) diluido al 10% en 0.02 M de KPBS tampón fosfato potásico salino con 0,25 o 0,30% de tritón X-100. Las secciones se incubaron toda la noche (mínimo 16 h) con el anticuerpo primario (suero policlonal anti-conejo de proteína humana HSP-90) diluido en KPBS con 1% de suero normal y 0,25% y 0,30% de tritón X-100 a una concentración de 1/500. Al día siguiente las secciones se lavaron varias veces para eliminar el antisuero no diluido y se incubaron durante 90m a temperatura ambiente con el consiguiente antisuero secundario biotilado a una concentración de 1:200. Las secciones marcadas con biotina se lavaron y se incubaron posteriormente otros 30m con un complejo avidina-biotina-peroxidasa (DAKO), diluido a 1:100 en KPBS conteniendo 0,25% de tritón. Finalmente se realizó el revelado e un 0,04% de peróxido de hidrógeno y 0,5% 3-3'diamino bencidina (DAKO).

D. Cuantificación y estudios estadísticos

El recuento de núcleos de c-Fos positivos se realizó en el núcleo paraventricular del hipotálamo en tres regiones: (a) En el área Lateral Magnocellular (PaLM), (b) Medial Parvocellular (PaMP) and (c) Ventral o Lateral Parvocellular. Los recuentos por campo en cada área se expresaron como las medias individuales de cada animal o del experimento (\pm error standard) por grupo. En este experimento las diferencias entre grupos en relación a las células positivas para c-Fos se determinaron utilizando dos tipos de ANOVA:

- a) para exposiciones agudas, un ANOVA de dos Vías para cada área por separado teniendo en cuenta como factores, la potencia de radiación (0,3, 12 w) X el tiempo transcurrido después de la radiación (90min o 24 hs);
- b) para exposiciones repetidas un ANOVA de dos vías para cada área teniendo en cuenta los siguientes factores: Radiación (radiado, no radiado) X el Número de exposiciones (única o repetida).

Se utilizó un ANOVA de dos vías para evaluar los niveles de estrés en relación a la temperatura. Los factores considerados son la potencia de radiación (0, 3, 12 W) y el tiempo antes y después de la radiación (0, 30, 60, 90 min y 24 h). Finalmente un ANOVA de una vía para evaluar las diferencias significativas en los niveles de SAR respecto a las diferentes potencias de radiación (0, 3, 12 W). Se aplicaron transformaciones del logaritmo natural para obtener la normalidad y la homocedasticidad. Se aplicó un test de Bonferroni para las comparaciones post hoc. Se consideraron diferencias significativas a partir de $p < 0.05$. El test de Tukey se usó para comparaciones a posteriori.

III. RESULTADOS

A. Resultados de SAR

El ANOVA de una Vía indica diferencias significativas entre todos los valores de SAR para las distintas potencias ($P < 0.001$ en ambos casos, Tabla 1; Fig. 2)

Tabla 1. Valores de SAR experimental en el cerebro y en el cuerpo calculados a partir de la potencia (P) y el campo eléctrico (E).

Medidas experimentales de absorción específica (SAR) por FDTD				
	Mean SAR in midbrain (W/kg)	Peak SAR in 1g midbrain	Mean SAR in body (W/kg)	Peak SAR in 1g body
P= 3W E=40.28 V/m	$0.0776 \pm 16.1 \cdot 10^{-4}$	$0.220 \pm 4.10 \cdot 10^{-3}$	$0.041 \pm 8.10 \cdot 10^{-4}$	$0.203 \pm 4.10 \cdot 10^{-3}$
P=12W E=80.56 V/m	$0.301 \pm 6.10 \cdot 10^{-4}$	$0.901 \pm 20.1 \cdot 10^{-3}$	$0.160 \pm 35.10 \cdot 10^{-4}$	$0.791 \pm 17.1 \cdot 10^{-3}$

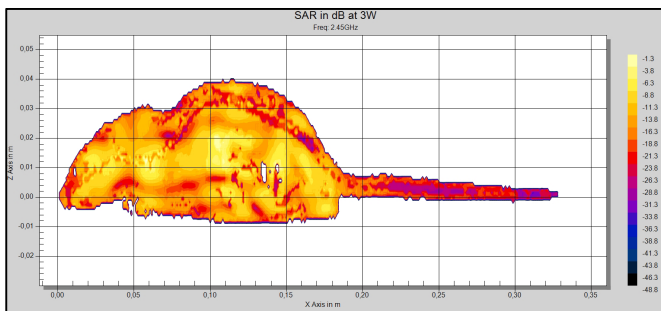


Fig. 2. Distribución local de SAR en el fantoma de rata expuesto a 2,45 GHz y 3 W. in the plane X = 0:33.

B. Resultados de Morfología

- Activación celular a los 90m después de una exposición aguda.

El nivel de activación celular desencadenado por la radiación fue muy similar en las áreas PaLM y PaMP PaV 90 min después de la radiación. La proporción de células c-Fos inmunopositivas en el NPV en cada área indica que el incremento en la potencia tiene una influencia significativa en la activación celular, por eso la expresión de c-Fos es significativamente más alta en animales radiados a 12 w en el PaLM que los animales no radiados o en la región medial PaMP y PaV que los animales que reciben bajas dosis de radiación ($P < 0,0001$). El recuento celular es más bajo que en

los animales expuestos a 3 W y es significativamente diferente que los animales expuestos a 12 W ($P < 0,0001$).

- Activación celular a las 24 hs después de una exposición aguda.

Hay diferencias estadísticamente significativas en la media en el recuento de células c-Fos inmunopositivas en ambas áreas del núcleo PVN PaLM y PaMP, PaV ($p < 0.001$) en relación a los diferentes valores estudiados para los factores potencia y tiempo (90 m y 24 h) o la interacción entre ambos.

El número de células Fos positivas se ha decrementado un día después de la exposición, así hay diferencias significativas entre el recuento de animales radiados con 0 y 12 w ($p < 0,001$).

Veinticuatro horas después de la exposición había diferencias significativas entre los animales no radiados (0 W) y los otros dos grupos (3 y 12 W) ($p < 0,0001$). Sin embargo no hay diferencias significativas entre los dos grupos de animales radiados ($p = 0,151$ vs. $p = 0,150$) ver Fig. 3.

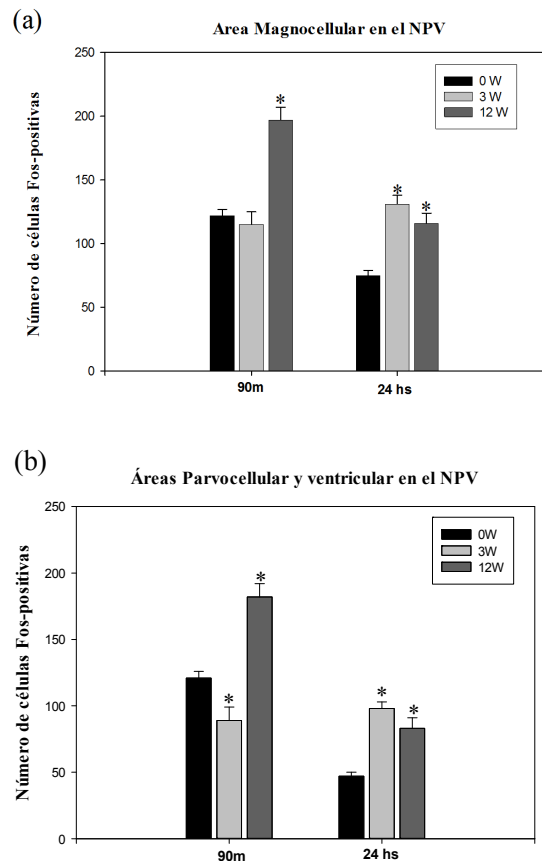


Fig. 3. Los histogramas muestran la densidad de neuronas C-Fos positivas en el núcleo Paraventricular (Pa) de ratas después de una única exposición aguda a radiofrecuencia de 2.45 GHz en las áreas (a) lateral magnocelular y (b) area (PaLM) medial (PaMP) y ventral (PaV) parvocelular (neuronas/mm², promedio \pm SEM).

- Comparación entre la activación neuronal aguda y repetida.

La exposición repetida de la radiación de microonda genera niveles significativos de activación celular de núcleos de c-Fos en el núcleo Paraventricular; con un recuento de células positivas de más de un 100% en ambas áreas con

respecto a los animales expuestos a una única dosis aguda de radiación y los animales control no radiados repetidamente ($P < 0,05$) (ver Fig. 4). En contraste no hay diferencias significativas entre el recuento de células c-Fos positivas en los animales no radiados que se mantienen en el cepo de metacrilato una vez o varias veces de forma repetida $p \geq 0,05$ en ambos casos).

Los animales a los que se sometió a exposición repetida a la radiación mostraron diferencias significativas en los grados de activación celular en relación a los animales control ($p < 0,0001$) en ambas áreas cerebrales (PaLM and PaMP, PaV) en el núcleo Paraventricular (ver Fig. 4). Sin embargo el número de células c-Fos positivas en el area Magnocelular no fue significativamente diferente entre los animales expuestos a una única dosis de radiación y los animales no radiados ($p = 0,608$), ver Fig. 4. En contraste en la areas parvocelular y ventricular del núcleo Paraventricular, las diferencias significativa ($p = 0,014$) en la expresión de c-fos expresion se observan entre los animales expuestos a una dosis única de radiación y los animales no radiados (ver Fig. 4).

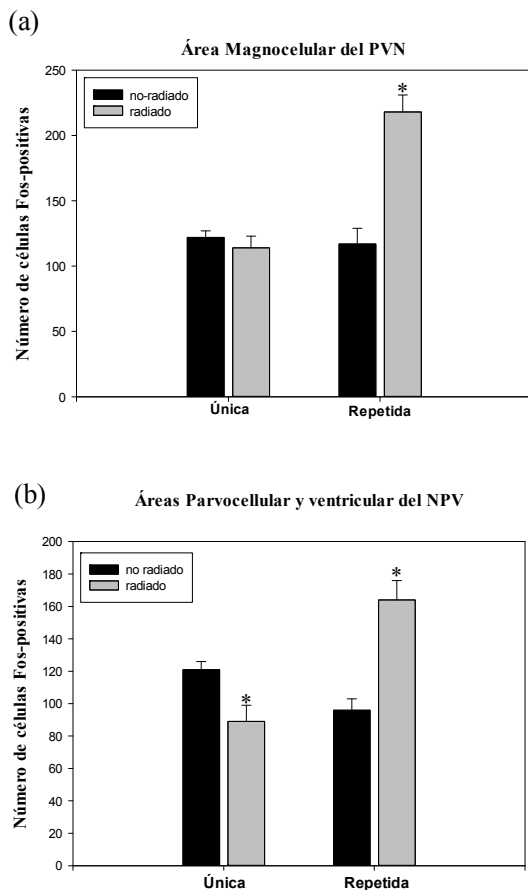


Fig. 4. Los Histogramas muestran la densidad de neuronas c-Fos positivas en el núcleo paraventricular (Pa) de ratas después de 10 exposiciones a 2.45 GHz de radiofrecuencia en las áreas (a) lateral magnocelular y (b) area (PaLM) medial (PaMP) y ventral (PaV) parvocelular (neurons/mm², mean \pm SEM).

IV. CONCLUSIONES

Los estudios morfológicos de la expresión de c-Fos en el núcleo PVN revelaron un importante grado de reactividad a la exposición de radiación de microondas de 2,45 GHz a niveles no térmicos de SAR en diversas poblaciones neuronales. Esto

indica que varios circuitos funcionales pueden actuar simultáneamente.

El tiempo de exposición con dosis única o repetida de radiación es un factor determinante, pero posiblemente no es el único, en establecer los niveles de potencia que pueden producir respuesta en este núcleo.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

- [1] P. E. Sawchenko and L.W. Swanson, "Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic response," *Science*, vol. 214, no. 4521, pp. 685–687, 1981.
- [2] K. J. Kovács, "Measurement of immediate-early gene activation-c-fos and beyond," *J Neuroendocrinol*, rev. 20, no. 6, pp. 665–672, 2008.
- [3] N. N. Lebedeva, "Reactions of the human central nervous system to electromagnetic fields with different biotropic parameters," *Biomeditsinskaya Radioelektronika*, vol 1, pp. 24–36, 1998.
- [4] N. S. Novikova, T. B. Kazakova, V. Rogers, A. Korneva, "Expression of c-Fos Gene in the rat hypothalamus in electrical pain stimulation and UHF stimulation of the skin," *Neurosci Behav Physiol*, vol. 38, no. 415–420, 2008
- [5] S. N. Shanin, E. G. Rybakina, N. N. Novikova, I. A. Kozinets, V. J. Rogers, E. A. Korneva, "Natural killer cell cytotoxic activity an c-Fos protein synthesis in rat hypothalamic cells after painful electric stimulation of the hind limbs and EHF irradiation of the skin," *Sci Monit*, vol. 11, no. 9, pp. 309–31, 2005.
- [6] M. J. McKinley, D. K. Hards, B. J. Oldfield, "Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fosimmunochemistry and neural tracing," *Brain Res*, vol. 653, no. 1–2, pp. 305–314, 1994.