# 1. RESUMEN

Se ha informado sobre los efectos de los campos electromagnéticos (CEM) en los sistemas biológicos y se ha encontrado que éstos pueden afectar actividades metabólicas celulares tales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Por otra parte, existen diversas investigaciones que indican que los CEM pueden afectar la regulación de la expresión de genes. Dado lo anterior, el presente estudio tuvo por objeto elaborar un promotor sintético con elementos de respuesta a campos magnéticos con la perspectiva de que en un futuro este promotor pudiera usarse para expresar genes de importancia médica y biotecnológica. Actualmente existen múltiples estrategias para regular la expresión génica, sin embargo pueden presentar efectos colaterales indeseables. El presente trabajo se enfocó en la construcción de un vector que contiene el promotor de hsp70 además de contener como reportero el gen de luciferasa que fue denominado pCEM, para luego transfectar el vector en la línea celular Hela y evaluar el efecto de los CEM a 8, 24, 48 y 80 μT. Además se evaluó el efecto de los CEM sobre las líneas celulares INER37, BMK16 y RMA-E7 a las intensidades de 8 y 80 μT con 60 Hz de frecuencia de onda sinusoidal. Las células transfectadas con pCEM fueron expuestas a los siguientes tratamientos: a) Choque térmico (CT) a 43°C por 30 minutos como control positivo, b) CEM de 8 μT 30 minutos y c)Sin CT ni exposición a CEM por 30 minutos como control negativo, para después mantener por 30 minutos a 37°C. Se observó que la expresión de la luciferasa estaba incrementada tanto en el grupo expuesto a choque térmico como el expuesto a CEM comparado con el grupo no expuesto en las líneas celulares INER37, BMK16 y HeLa ($P<0.05$). Se determinó también el efecto combinado del CEM y el choque térmico. Tratando un grupo inicialmente con CT y después con CEM, y un segundo grupo inicialmente con CEM y después con CT; en este caso se compararon con grupos sin transfectar con pCEM y transfectados con pCEM sin exponer a CEM. En las líneas celulares HeLa y BMK16 se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de luciferasa, al exponer a los tratamientos con CT y CEM con respecto a los demás grupos ($P<0.05$). Adicionalmente se llevaron a cabo experimentos *in vivo* en ratones *Mus musculus* línea Balb/c inyectados con el vector pCEM expuestos a CEM, comparando con pNFKB-luc (vector comercial que contiene el gen de luciferasa) y pCEM sin exponer a CEM. Se encontró que se podía afectar la expresión de luciferasa con respecto a los grupos no expuestos a CEM. Se concluye que el vector pCEM al responder significativamente a la aplicación de un campo electromagnético, evaluado por las modificaciones mostradas en su expresión génica, puede ser utilizado en el futuro para expresar genes de importancia terapéutica mediante su regulación con CEM de 60 Hz de frecuencia a las intensidades aquí probadas.

## ABSTRACT

There are many reports about the effects of the electromagnetic fields (EMF) in the biological systems and it has been found that these fields can modify cellular and metabolic activities such as the synthesis of DNA, RNA and proteins. On the other hand, several investigations indicate that the EMF can affect the regulation of the genetic expression. According to this, the present study was undertaken to make a synthetic promoter with response elements to magnetic fields, with the perspective than in the future, this promoter could be used to express genes of medical and biotechnological importance. At the moment, there are multiple strategies to regulate the genetic expression, nevertheless, they can present undesirable side effects. The present work was focused in the construction of a vector that contains the promoter of hsp70 besides to contain a reporter like the gene of luciferase that was denominated pCEM, and later was transfected in cellular lines INER37, BMK16 and RMA-E7 and thus to evaluate its response to EMF. The intensities used were of 8 and 80 mT at 60 Hertz of frequency of sinusoidal wave; also it was evaluated the effect of the EMF to 8, 24, 48 and 80mT in Hela cell line. The cells transfected with pCEM were exposed to the following treatments: a) Thermal shock (TC) to 43°C by 30 minutes as a positive control, b) EMF of 8mT 30 minutes and c) Without TC nor exposition to EMF by 30 minutes as a negative control, later they were kept by 30 minutes to 37 C. It was observed that the expression of luciferase was increased in the exposed group to thermal shock as the exposed one to EMF compared with the non exposed group in cellular lines INER37, BMK16 cells and HeLa($P<0.05$). Also was determined the combined effect of the EMF and the thermal shock. Treating a group at the first time with TC and later with EMF, and a second group initially with EMF and later with TC; in this case they were compared with non transfected groups and transfected with pCEM without exposing to EMF. In HeLa and BMK16 a significant increase in the expression of luciferase levels was observed, when they were exposed to the treatments with TC and EMF in reference to the other groups ($P<0.05$). Additionally experiments were carried out in mice from the *Mus musculus* line Balb/c injected with the vector pCEM exposed to EMF, comparing with pNFKB-luc (commercial vector that contains the gene of luciferase) and pCEM without exposing to EMF. It was found that the expression of the enzyme luciferase with respect to the groups non exposed to EMF was increased. In conclusion; our data suggested that the constructed pCEM can be modulated by application of a magnetic field, evaluated by the modifications shown in its genetic expression. Furthermore this vector could be used to express genes of therapeutic importance by means of its regulation with EMF at 60 Hertz of frequency to the intensities tested here.

## 2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen numerosos informes relacionados con los efectos benéficos de los campos electromagnéticos sobre los organismos, y se ha encontrado que estos campos pueden ser usados entre otras áreas, en la conservación de alimentos mediante inactivación microbiana así como la regeneración ósea, tratamiento de cefaleas, diagnostico de enfermedades etc.

Además, existen numerosos artículos que mencionan que los campos electromagnéticos pueden ocasionar diversos efectos a nivel celular como son estimulación de la trascripción celular y traducción. Estos efectos son similares a los ocasionados por factores de estrés celular, específicamente por el choque térmico.

Por otra parte, actualmente se buscan nuevas alternativas para tratar algunos tipos de enfermedades que afectan la salud del ser humano. Por esto, en el presente trabajo se llevó acabo la construcción de un vector que contiene elementos de respuesta a campos magnéticos. Mediante esta alternativa se pretende controlar el tiempo y localización de la expresión de los genes que sean regulados por dicho promotor. El campo magnético que se utilizó en este estudio fue de una frecuencia de 60 Hz.

En este momento existen múltiples estrategias para regular la expresión génica como son: hipertermia, radiación ionizante, drogas etc. Sin embargo pueden presentar efectos colaterales indeseables. Por su parte, los CEM pueden afectar la regulación de la expresión de genes tanto *in vivo* como *in vitro*, por lo cual el presente estudio tiene por objeto elaborar un promotor sintético

con elementos de respuesta a campos magnéticos con el fin de modular la expresión de genes de importancia médica. En este trabajo se seleccionó el promotor hsp70 que contiene secuencias sensibles a CEM de 60 Hz y se insertaron en el vehículo pNFKB-luc para obtener pCEM, a este vehículo después se determinó la capacidad para expresar genes terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*.

## 3. HIPÓTESIS

Un vector que contenga un promotor constituido de elementos de respuesta a campos electromagnéticos de 60 Hz puede ser usado para manipular la expresión génica.

# 4. OBJETIVOS

## 4.1 OBJETIVO GENERAL

Construir un vector que contenga elementos de respuesta a campos electromagnéticos de extremadamente baja frecuencia (60 Hz) para evaluar su expresión génica en gen reportero de luciferasa.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Obtener las secuencias de *hsp70* sensibles a CEM de 60 Hz a partir de linfocitos de sangre venosa periférica humana.

2.- Realizar la inserción de secuencias altamente sensibles a CEM en el vector comercial pNFKB-luc eliminando previamente su promotor original.

3.- Determinar el grado de expresión de luciferasa en las líneas celulares HeLa, Iner-37, BMK16, RMA-E7 expuestas a CEM de 8, 24, 48 y 80 μT de 60 Hz mediante luminometría.

4.- Determinar la expresión de las líneas celulares HeLa, Iner-37, BMK16 expuestas a CEM de 60 Hz mediante análisis de Western Blot.

5.- Evaluar el grado de expresión mediante luminometría en tejido muscular de ratones *Mus musculus* inyectado con pCEM expuestos a CEM de 60 Hz.

6.- Detectar la expresión mediante Western Blot en tejido muscular de *Mus musculus* inyectado con pCEM expuestos a CEM de 60 Hz.

# 5. ANTECEDENTES

## 5.1. Física De Los Campos Electromagnéticos (CEM)

Si bien nuestro conocimiento de los fenómenos eléctricos es relativamente reciente, el hombre ha tenido noticia de los fenómenos magnéticos desde tiempos muy remotos. Así, Tales de Mileto (640-546 AC) hablaba de las atracciones magnéticas y los Chinos emplearon desde hace más de 2000 años la brújula magnética para la navegación y viajes en los desiertos de Mongolia. Este aparato se fundamenta en adoptar una orientación, la cual es ejercida por un campo magnético circundante (Wood, 1991).

El campo magnético es la región en el espacio en la cual un objeto magnetizado puede a su vez magnetizar a otros cuerpos de naturaleza ferromagnética o paramagnética. Recientemente se descubrió que la configuración del campo magnético puede obtenerse con el auxilio de una brújula o con limaduras de hierro. Por otro lado si se rompe un imán en un intento de separar los polos, se encuentran otros nuevos formados en los extremos rotos; si uno de esos pedazos se rompe, otra vez aparecen de nuevo dos polos de clase opuesta. Tantas veces como se repita este proceso se tiene el mismo resultado y por lo tanto no es posible obtener un polo magnético aislado (Stewart, 1979; Alonso y Rojo, 1981).

En 1820 el Físico Danés Hans Oersted observó que una corriente eléctrica puede cambiar la orientación de la aguja de una brújula en forma semejante a como lo hace un

imán. Este descubrimiento puso de manifiesto que en un conductor con corriente alterna existe también un campo magnético y que el movimiento de cargas eléctricas está íntimamente relacionada con el origen de los campos magnéticos (Galar-Castelan, 1988). Posteriormente Faraday, Henry y Ampere corroboraron los resultados de Oersted ( De la Rosa, 1995).

Por otra parte, se dice que existe un campo eléctrico en un punto, si actúa una fuerza de origen eléctrica sobre un cuerpo estacionario cargado situado en dicho punto. Cualquier otra carga eléctrica colocada en un punto de ese campo eléctrico, experimenta una fuerza producida por su interacción con la primera carga. La intensidad del campo eléctrico en un punto es igual a la fuerza que el campo ejerce sobre una unidad de carga eléctrica colocada en dicho punto (Lin, 1994). La intensidad de dicho campo está dado en volts por metro (V/m) y la exposición a él, produce la movilización de cargas en la dirección del campo eléctrico produciendo una corriente eléctrica medida en amperes (A), la distribución de esta corriente y la dirección de su flujo es cuantificado en amperes por metro cuadrado ($A/m^2$) y se conoce como densidad de corriente (Walleczec, 1992).

Cuando los campos magnéticos y eléctricos varían con el tiempo en una determinada región, se dice que ambos campos están estrechamente relacionados. Es decir, todo campo eléctrico que varía con el tiempo va siempre acompañado de un campo magnético, también variable y a la inversa, por lo cual si se produce un campo magnético, este va acompañado de otro campo eléctrico asimismo variable. Esta interrelación entre los campos eléctricos y

magnéticos hace que se hable más bien de un campo electromagnético (CEM) como una sola entidad física (Parker, 1993).

La dirección del campo magnético en un lugar se determina por la orientación que adopta un pequeño imán o brújula colocado en el lugar, en el cual el polo norte del imán tiende a orientarlo en dirección del campo y el polo sur queda sometido a una fuerza que tiende a moverlo en la dirección opuesta. El resultado es que ambas fuerzas producen una resultante que hace girar al imán hasta que se orienta paralelamente a la dirección del campo, cuando las fuerzas sobre los polos son directamente opuestas y la resultante es cero. Los campos magnéticos se representan por líneas de fuerza que están dirigidas de los polos norte a los polos sur y que son tangentes a la dirección del campo en cada punto (Parker, 1993).

De lo anteriormente expuesto, se deduce que el magnetismo se encuentra muy relacionado con la electricidad. Una carga eléctrica está rodeada de un campo eléctrico, y también de un campo magnético si se está moviendo. Esto se debe a las distorsiones que sufre el campo eléctrico al moverse la partícula. Einstein explicó este fenómeno con la teoría especial de la relatividad. Dicho de otra forma, las cargas en movimiento tienen asociados tanto un campo eléctrico como un campo magnético. El movimiento de la carga eléctrica produce un campo magnético. Curiosamente, puesto que el movimiento es relativo, también lo es el campo magnético, ya que si uno se mueve a la par de la carga de modo que no está en movimiento con respecto a nosotros no se detectará campo magnético alguno.(Hewitt, 1998).

En función de la respuesta que los materiales presentan a un campo magnético se distinguen tres categorías: diamagnéticos, paramagnéticos y ferromagnéticos, lo que

será función del campo magnético que se genera en los átomos como consecuencia del movimiento de sus electrones. Las sustancias diamagnéticas al ser colocadas en un campo magnético se magnetizan en dirección contraria al campo; siendo esta magnetización unas mil veces menor que la de las sustancias paramagnéticas, aunque el efecto varía de una sustancia a otra. El diamagnetismo se debe a un efecto de distorsión de las órbitas electrónicas debido al campo magnético aplicado, lo que equivale a producir en cada átomo un momento magnético que tiene dirección opuesta a la del campo magnético, pero en una sustancia diamagnética sus átomos no poseen un dipolo magnético neto debido a que los momentos dipolares tanto los de orbítales como los de espín se cancelan. En consecuencia, una muestra macroscópica de estos materiales tampoco presenta un dipolo magnético; por lo que no es atraída por un magneto. En cambio, un material paramagnético presenta la propiedad de ser atraído por un magneto. Esto es consecuencia de que sus átomos o moléculas tienen momentos magnéticos permanentes que tienden a orientarse en la dirección de un campo magnético externo al que se exponen, convirtiéndose así en magnetos. Este magnetismo es suprimido al momento de eliminar el campo magnético externo. La orientación promedio de los dipolos magnéticos elementales depende de la intensidad del campo aplicado que tiende a alinearlos. Entre estos materiales se encuentran los radicales y compuestos de elementos de transición. Por otro lado, en los materiales ferromagnéticos, se presenta un efecto paramagnético muy fuerte en el que estos se encuentran magnetizados en ausencia de un campo magnético externo. Esta magnetización natural indica que los momentos magnéticos de sus átomos o moléculas tienden a orientarse paralelamente como consecuencia de las interacciones entre ellos. Un análisis cuidadoso del fenómeno ha indicado que los que tienden a alinearse son los espines de los electrones; el

fenómeno ferromagnético es puramente cuántico, por lo que no es explicable por la física clásica. El resultado de exponer este tipo de materiales ante otro campo magnético externo es la formación de un nuevo campo que se suma al externo. (Pothakamury *et al.*, 1993).

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas, como aquellas de los circuitos domésticos de 60 Hz, irradían muy poca energía, ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo; los rayos X y Gamma. Por ello las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que se producen son por mecanismos diferentes a aquellos que involucran el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas blanco (Strother, 1980, Rojo, 1981).

La frecuencia que se usa comúnmente en investigación es similar a la producida por la corriente eléctrica alterna de los cables de tendido eléctrico, ésta varía como una onda senoidal con frecuencia de 60 Hz. Los CEM generados por estas corrientes, tienen esa misma frecuencia y por tanto se encuentran en la región del espectro electromagnético denominado de frecuencia extremadamente baja, región comprendida entre los 3 y 3 x $10^3$ Hz (Muñoz, 1994).

### 5.1.1 Inducción Electromagnética

Faraday y Henry descubrieron que se podía generar corriente eléctrica en un alambre con el simple movimiento de meter y sacar un imán de una bobina, y que la producción de voltaje dependía del movimiento relativo del conductor y el campo magnético. La magnitud del voltaje inducido depende del ritmo al que el alambre corta las líneas del campo magnético, o bien que tan rápido cambia el campo magnético. El fenómeno se resume en el enunciado de la ley de Faraday: El voltaje inducido en una bobina es proporcional al producto del número de espiras y la razón de cambio del campo magnético dentro de dichas espiras. Por otra parte, la magnitud de la corriente depende de la resistencia de la bobina y del circuito al que está conectada. El fenómeno es similar al mencionado anteriormente en los efectos del campo magnético sobre una corriente eléctrica. Si la corriente fluye hacia la derecha, los electrones experimentan una fuerza perpendicular hacia arriba, como no hay trayectoria conductora por la que los electrones pueden fluir hacia arriba el alambre también experimenta una fuerza dirigida hacia arriba (efecto motor). Si desplazamos hacia abajo un alambre que inicialmente no transporta corriente, los electrones en su interior experimentan una fuerza deflectora perpendicular a su movimiento, aquí si hay trayectoria conductora en dicha dirección y los electrones la recorren, constituyéndose así una corriente, a esto último es a lo que se le ha llamado el "Efecto Generador" (Hewitt, 1998). Según el concepto moderno de la inducción electromagnética, lo que se induce son campos eléctricos y magnéticos que a su vez dan lugar a los voltajes que se han estado considerando. La inducción se efectúa

haya o no cables conductores o medios materiales. La ley de Faraday en un sentido más general establece que: Se induce un campo eléctrico en toda región del espacio en la que exista un campo magnético que varíe con el tiempo. La magnitud del campo eléctrico inducido es proporcional a la rapidez con la que cambia el campo magnético. La dirección del campo eléctrico inducido es perpendicular al campo magnético variable. El efecto secundario complementario es el propuesto por James Clerk Maxwell en 1860, es decir, se induce un campo magnético en toda región del espacio en la que exista un campo eléctrico que varíe con el tiempo (Galar-Castelán, 1988).

### 5.1.2 Ondas Electromagnéticas

Cuando se agita de un lado a otro en el espacio una barra cargada se producen ondas electromagnéticas. Esto se debe a que la carga al moverse constituye una corriente eléctrica, y una corriente eléctrica siempre está rodeada de un campo magnético, como la corriente es variable, el campo magnético también es variable, el cual de acuerdo a la ley de Faraday produce un campo eléctrico variable, y el campo eléctrico variable de acuerdo a lo enunciado por Maxwell, induce a su vez un campo magnético variable. Una onda electromagnética se compone de campos eléctricos y magnéticos vibrantes que viajan juntos y no requieren medio alguno para ello. Los campos vibrantes emanan de la carga vibrante. En todo punto de la onda, el campo eléctrico es perpendicular al campo magnético y ambos son perpendiculares a la dirección de propagación de la onda. La magnitud de un campo inducido (el magnético y el eléctrico) depende de la razón de cambio de la vibración, pero también del movimiento del otro campo, es decir la rapidez con la que el otro campo emana la carga vibrante, si la rapidez fuese muy pequeña el campo inducido es débil por lo que la inducción mutua se atenuaría hasta anularse pero

en este caso se habría destruido la energía, siendo incompatible con la ley de la conservación de la energía. Si la rapidez de emanación fuera muy elevada los campos inducidos aumentarían de magnitud sin cesar, otro caso incompatible con la conservación de la energía. Sin embargo, a cierta rapidez crítica la inducción mutua continuaría indefinidamente, sin pérdidas ni aumentos de energía. Maxwell encontró que la rapidez crítica era de 300,000 km/s, pero ésta era la velocidad de la luz, por lo que entonces acababa de descubrir la naturaleza de la luz. La velocidad de propagación de las ondas electromagnéticas en el vacío es independiente de la frecuencia y de la longitud de onda (Hewitt, 1998).

### 5.1.3 Radiación Electromagnética y Espectro Electromagnético

En la naturaleza existen cargas oscilantes, de modo que hay muchas fuentes naturales de radiación electromagnética. La luz y la radiación térmica, por ejemplo son ondas electromagnéticas, que son el resultado de la oscilación de cargas eléctricas en los átomos del emisor. Desde el siglo antepasado se descubrió que la luz emitida por una flama de sodio sufría pequeñas variaciones cuando se le sometía al campo magnético de un imán. El físico H.A. Lorentz por su parte, demostró que las cargas eléctricas de los átomos de vapor de sodio, al estar sometidas a las fuerzas del campo magnético producían variaciones en la frecuencia de la luz emitida, las cuales eran explicadas por la teoría de Maxwell como oscilaciones de la carga del electrón. Estas fueron las primeras evidencias de la identidad entre la radiación electromagnética y la luz (Hewitt, 1998). Antes del siglo XIX las ondas electromagnéticas estudiadas eran las que caían dentro del espectro visible o luz, es decir aquellas cuya longitud de onda está comprendida entre

los 4 x $10^{-7}$ y 7.2 x $10^{-7}$ m, pero la teoría de Maxwell predice que pueden existir ondas electromagnéticas de cualquier longitud de onda o frecuencia. El espectro electromagnético, conocido y estudiado, va desde los miles de kilómetros para las ondas de los campos magnéticos hasta los

$10^{-16}$ m para los rayos gamma y los cósmicos (Parker, 1993).

La propagación de los campos electromagnéticos como un proceso ondulatorio explica satisfactoriamente muchos fenómenos importantes, pero falla en la explicación del intercambio de energía cuando la radiación electromagnética interacciona con la materia, pues solamente puede intercambiar cantidades discretas o cuantos de energía, lo que sugiere una estructura corpuscular de la radiación que Einstein llamó fotón. Actualmente se acepta que la radiación electromagnética tiene un comportamiento dual (Galar-Castelán, 1988). Esto es concebible, si se considera la sugerencia del físico francés De Broglie quien sugirió que la materia y las partículas (ya fueran fotones, electrones, átomos, balas y hasta seres humanos) tienen una longitud de onda relacionada con su momentum. La longitud de onda de una partícula de gran masa y poca rapidez es demasiado pequeña como para poder detectarse por medios convencionales, pero una partícula pequeña como un electrón que se desplaza con gran rapidez posee una longitud de onda detectable que es miles de veces menor que el de la longitud de onda de la luz visible (Hewitt, 1998).

Las oscilaciones electromagnéticas en la región de bajas frecuencias y longitudes de onda muy largas (como aquellas de los circuitos domésticos de 50-60 $Hz^{1}$) irradían muy poca energía, ya que se sabe que la energía de una onda electromagnética es directamente proporcional a su frecuencia e inversamente proporcional a su longitud de

onda. A medida que la frecuencia aumenta, se llega a longitudes de onda muy cortas y las radiaciones de esta clase llegan a depositar una cantidad de energía tan considerable que a tales emisiones se les denomina radiaciones ionizantes, como por ejemplo, los rayos X y Gamma. Queda entonces claro que las radiaciones generadas por los CEM de frecuencia de 60 Hz son del tipo no ionizante, es decir, los efectos que produzcan deberán ser por mecanismos diferentes a aquellos que involucran el desplazamiento de electrones en átomos y moléculas (Strother, 1980, Rojo, 1981).

Como anteriormente se mencionó, las ondas electromagnéticas son el producto de campos eléctricos y magnéticos y la intensidad de la radiación electromagnética puede ser llamada densidad de poder y se mide en watts/$m^2$. Los campos electromagnéticos existen en forma de ondas electromagnéticas solo en el campo lejano, es decir, alejados de la fuente. En el campo cercano, los campos eléctricos y magnéticos deben ser considerados como simples campos. El límite entre el campo lejano y el cercano es en la mayoría de los casos, su longitud de onda. En el caso de los campos de frecuencia extremadamente baja, donde la longitud de onda es de miles de kilómetros, los campos magnéticos y eléctricos son siempre evaluados separadamente. En los casos de frecuencias mayores como en las microondas, donde su longitud de onda es tan corta que la exposición humana ocurre en el campo lejano, no es necesario considerar los campos eléctrico y magnético por separado
(Juutilainen y Lang, 1997).

Forma de la Onda: Describe el cambio, con el tiempo, de los campos magnéticos o eléctricos variables. La mayoría de las fuentes de los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (FEB), los de frecuencia muy baja (FMB) y de ondas

de radio (RF) producen campos con formas de onda sinusoidales, pero algunas fuentes emiten campos electromagnéticos con otras formas, como triangulares o rectangulares. Hay formas de onda con alto rango de cambio (en unidades de la intensidad del campo por unidad de tiempo) que inducen corrientes fuertes en tejidos y son biológicamente más activas que formas de onda con bajo rango de cambio (Juutilainen y Lang, 1997).

Por otra parte las radiofrecuencias son comúnmente moduladas por otra señal de más baja frecuencia para hacerla que lleve la información. Las formas más comunes de modulación son la amplitud modulada y la frecuencia modulada. La amplitud modulada puede ser importante en el efecto biológico de la radiación de radiofrecuencias. Muchos estudios *in vitro* señalan que las radiofrecuencias débiles, de amplitud modulada a frecuencias bajas, podrían tener efectos específicos similares a los efectos reportados por campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (Postow y Swicord, 1996).

La frecuencia que se maneja en el presente estudio es similar a la producida por la corriente eléctrica de los cables de tendido eléctrico, ésta varía como una onda sinusoidal con una frecuencia de 60 Hz. Los CEM generados por estas corrientes tienen esa misma frecuencia, y por tanto se encuentran en la región del espectro electromagnético denominado de frecuencia extremadamente baja, región comprendida entre los 3 y los 3 x $10^3$ Hz (Muñoz, 1994).

### 5.1.4 Campo Magnético de la Tierra

El planeta tierra se comporta como si fuera un imán gigantesco cuyo norte magnético se encuentra cercano al polo Sur geográfico y el Sur magnético cercano al polo Norte

geográfico, sin embargo para mantener la congruencia con la terminología usada en la literatura se prefiere llamar polo Norte magnético de la tierra al que se encuentra en las cercanías del polo Norte geográfico y polo Sur magnético al que se encuentra cercano al polo sur geográfico. El eje magnético de la tierra tiene una inclinación de aproximadamente 11.5° con respecto al eje de rotación de la tierra, y por lo tanto los polos magnéticos no coinciden con los polos geográficos. Además, existe evidencia de que el eje magnético ha sufrido inversiones completas en su dirección hasta nueve veces en los últimos 4 millones de años. En general se considera que el campo geomagnético es originado por el movimiento de cargas eléctricas en torno al eje de rotación de la tierra, constituyendo así una corriente eléctrica neta en trayectoria circular y que estas corrientes están vinculadas al movimiento de convección de partículas portadoras de carga eléctrica debido al gradiente térmico del fluido nuclear y al arrastre de las mismas por el movimiento de rotación del globo terráqueo. También existen influencias externas, principalmente el viento solar que consiste principalmente de partículas de alta energía portadoras de carga eléctrica. El campo geomagnético se considera de tipo constante, es decir no varía con el tiempo y por lo tanto tendría una frecuencia cercana a cero (Galar-Castelan, 1988).

### 5.2 Efectos Biológicos de los CEM

Una variedad de organismos muestran una clara magnetosensibilidad a la orientación en el campo magnético de la tierra. Entre éstas se encuentran las magnetobacterias (*Aquaspirilum magnetotacticum*), los paramecios (*Paramecium sp*), las planarias (*Dugesia sp*), los caracoles, las abejas (*Apis mellifera*), las salamandras (*Eurycea lucifiga*), los tritones (*Notophalamus viridescens*), los salmones (*Oncorhyncus nerka*) y

aun el hombre. De acuerdo con lo antes mencionado, la magnetosensibilidad esta ampliamente distribuida en el reino animal (Azanza y Del Moral, 1994, Goodman *et al.*, 1993).

Debido a su composición electrolítica los seres vivos son por lo general buenos conductores de la electricidad. A través de las membranas celulares y de los fluidos corporales intra y extracelulares existen corrientes iónicas, especialmente en las células nerviosas y musculares a las cuales debe estar asociado un campo magnético. Además, en los sistemas biológicos existen estructuras magnéticamente influenciables como los radicales libres que presentan propiedades paramagnéticas y aquéllas en las que intervienen sustancias ferromagnéticas. La respuesta de un sistema biológico a un campo magnético externo depende tanto de las propiedades magnéticas intrínsecas del sistema como de las características del campo externo y de las propiedades del medio en el cual tiene lugar el fenómeno. Experimentalmente se ha probado que en los cambios que sufren algunos parámetros de los sistemas biológicos por la acción de los campos magnéticos, influyen no solamente la intensidad, sino también las características espaciales y temporales de dicho campo. Dentro de este contexto, es diferente el efecto de un campo estático que solo produciría una rotación de los dipolos magnéticos, tendiendo a orientarlos en la dirección del campo y restringiendo su movilidad, ocasionando un efecto significativo si éstas participan en reacciones químicas, en contraste con uno que presenta variaciones periódicas con el tiempo y que pueden inducir movimientos oscilatorios sobrepuestos a la oscilación en los dipolos magnéticos moleculares, lo que de alguna manera podría afectar la velocidad de las reacciones químicas dependiendo de la amplitud, frecuencia y sentido de las variaciones del campo

magnético. En la literatura científica un gran número de trabajos prueban el efecto de los campos magnéticos sobre reacciones enzimáticas *in vitro,* dando efectos cualitativa y cuantitativamente diferentes dependiendo de la reacción que se trate y de las características del campo. Por otra parte, en los seres vivos al desplazarse en el seno de un campo magnético, como el terrestre o uno artificial, se induce una diferencia de potencial. Aunque el campo geomagnético es relativamente débil, estos efectos han sido observados en peces elasmobranquios. Se sabe que los tiburones y rayas poseen mecanismos basados en la inducción electromagnética para orientarse y localizar a sus presas y que la intensidad del campo magnético puede ser un factor limitante en la capacidad de respuesta del sujeto. También se ha propuesto que las aves migratorias poseen un mecanismo de orientación para la navegación basado en la generación de potenciales eléctricos inducidos electromagnéticamente. Igualmente, se ha encontrado que algunos microorganismos, particularmente bacterias, tienen la propiedad de orientar su movimiento en respuesta a un campo magnético externo (magnetotactismo), estas bacterias contienen una o dos cadenas intracelulares ricas en partículas de fierro. Asimismo se han descrito propiedades de magnetosensibilidad para una gran diversidad de insectos migratorios y aún en el ser humano, aunque en éste último el hallazgo es controversial (Lin, 1994).

Por otro lado, las ondas de radio y algunos tipos de luz ultravioleta, son algunas radiaciones no ionizantes a las que el hombre está frecuentemente expuesto. Los efectos biológicos de las primeras están siendo determinados en la actualidad, mientras que el daño que produce la luz ultravioleta en el ADN se ha relacionado con la formación de dímeros de timina, que es la lesión más frecuentemente inducida por esta radiación, por

lo general estos daños son eliminados por las células a través de mecanismos de reparación por escisión. Si las células expuestas no son eficientes en este tipo de reparación, el daño al ADN permanecerá y la célula sufrirá alteraciones considerables como en el caso del *Xeroderma pigmentosum* y del cáncer en la piel (Brusik, 1987).

Las radiaciones no ionizantes de frecuencia extremadamente baja, como es el caso de los campos magnéticos de 60 Hz han mostrado tener efectos sobre los sistemas biológicos y se ha informado que éstos pueden afectar la velocidad de las reacciones y una gran cantidad de procesos bioquímicos (Galar-Castelan, 1988; Davis, 1992; Morales-Matamoros, 1997; Simko and Mattsson, 2004).

Desde el punto de vista físico, se ha demostrado que es el campo eléctrico inducido por el campo magnético variable el que determina la respuesta celular. Sin embargo, la influencia de un campo magnético estático añadida al campo variable, también ha quedado demostrada, por lo que el mecanismo de interacción es más complejo que la sola influencia de campos eléctricos inducidos. Se supone que la interacción principal ocurre en la membrana celular y más específicamente en los canales iónicos, siendo los del calcio los que participan más activamente en las alteraciones biológicas ( Lin, 1994).

Asimismo, se ha informado que los CEM de extremada baja frecuencia tienen efectos sobre procesos bioquímicos importantes en el humano, como en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, cambios en la producción de hormonas, modificación de la respuesta inmune celular y cambios en el grado de crecimiento y diferenciación celular (Tenforde, 1991).

También se han obtenido evidencias experimentales que sugieren que los CEM afectan el crecimiento y la síntesis de ADN en varios tipos de células de origen procariotes y eucariotes (Cantini *et al.*, 1987; Goodman *et al.*, 1983; Liboff *et al.*, 1984; Mc Leod *et al.*, 1987; Rodan *et al.*, 1978; Takahashi *et al.*, 1987; Yen Patton *et al.*, 1988). Sin embargo, otras investigaciones realizadas acerca del efecto de campo eléctrico y magnético sobre la estructura del ADN en células de ovario de hámster chino (CHO) y en células humanas de la línea K562, señalan no haber detectado efectos medibles al aplicar campos de baja intensidad (Reese *et al.*, 1988; Fiorani *et al.*, 1992). No obstante, Mitnik *et al.*, (1995) reportan cambios a nivel fisicoquímico en la conformación del ADN al someterse a la acción de un campo eléctrico.

En la evaluación de los efectos de los campos electromagnéticos, otro modelo importante ha sido la síntesis y secreción de la hormona melatonina por la glándula pineal, expuestos a estos campos, para tratar de observar algún mecanismo promotor o inductor del cáncer, ya que se ha observado que al aumentar los niveles de esta hormona el nivel de estrógenos disminuye, reduciendo de esta manera el riesgo de desarrollar cáncer de mama, no obstante, el nivel y secreción de la hormona disminuye al estar bajo la influencia de un campo electromagnético (Kato *et al.*, 1993; 1994).

También, en otro estudio, Nordstrom *et al.*, (1983) encontraron un incremento en la frecuencia de malformaciones congénitas en niños de Suecia cuyos padres trabajaban en subestaciones eléctricas, lo cual podría indicar efecto genotóxico por los CEM.

Por otra parte Scarfi *et al.*, (1999), señalaron que en recientes estudios sobre la inducción de MN y proliferación celular en linfocitos humanos en cultivo, expuestos a un campo magnético sinusoidal de 50 Hz por 72 horas a intensidades de 0.05 a 1.0 mT,

no se encontró efecto genotóxico a las densidades de flujo magnético utilizadas, pero, el índice de proliferación celular se considera afectado significativamente en todas las intensidades utilizadas.

Se ha evaluado también el efecto de los campos eléctricos en embriones. En un estudio, se expusieron ratones C3H/He machos, a un campo eléctrico de 20 kV/m de 50 Hz de frecuencia por dos semanas. Después, cada ratón macho fue apareado con 2 hembras diferentes cada semana durante un período de 8 semanas para que las hembras fueran fecundadas por los ratones que habían sido expuestos al campo eléctrico y no se encontraron alteraciones en la sobrevivencia de los embriones (Kowalczuk *et al.*, 1990).

Por otra parte, es bien sabido que los CEM de baja frecuencia pueden producir una variedad de efectos benéficos en los sistemas biológicos. Los campos magnéticos pulsantes por ejemplo, son usados para la reparación de fracturas óseas, Andrew y Basset (1989), mostraron que el tejido óseo es sensible a campos magnéticos y eléctricos de baja frecuencia. Primero se sometió al tejido a un campo magnético variable de baja frecuencia y se detectó que en el tejido se inducía una corriente, ya que la lectura del voltímetro se modificaba en presencia de dicho campo. De este modo se inició el estudio de la posible utilización de campos magnéticos para la terapia de fracturas persistentes y en algunos casos, de osteoporosis. En este sentido, se puede mencionar un estudio en donde expuso ratas hembras no osteoporósicas a CEM pulsantes por seis meses y encontró un incremento en el volumen y actividad en la formación de hueso en las patas traseras (Mishima, 1988).

**5.3 Efecto de los CEM en microorganismos**

Se han realizado recientemente estudios en los que encuentra que los microorganismos son sensibles a los CEM, por ejemplo, Ramón *et al.,* (1987) expusieron a CEM de 800-1,000 Hz con intensidades entre 0.8 y 2.5 mT a *Bacillus subtilis* mutante FJ7, para evaluar el efecto en el crecimiento, y encontraron un aumento en el número de células comparado con el grupo control de referencia, además de modificarse la morfología de dicho bacilo, por lo cual, concluyeron que el campo magnético puede alterar el crecimiento del microorganismo. Por otro lado, Tabrah *et al.,* (1994) expusieron a *Salmonella typhimurium* a un CEM sinusoidal de 0.2 mT en conjunto con el mutágeno azida de sodio por 48 horas y encontraron un incremento en la tasa de mutación del orden del 14% en comparación con un grupo testigo no expuesto al campo magnético.

Mas recientemente, se ha investigado el efecto de los CEM sobre la inactivación del crecimiento sobre el género *Saccharomyces* que están presentes en yogurt y jugo de naranja. Al exponer el yogurt a una intensidad de 40 T (Tesla), sé encontró una disminución apreciable en el número de microorganismos en dichos productos. (Pothakamury *et al.*, 1993).

En un trabajo posterior Alipov *et al.*, (1994) aplicaron CEM de 30 μT con frecuencia de 7-12 Hz en *Escherichia coli* cepa K12AB1157 y demostraron que se afecta la conformación del genoma, división celular, síntesis de ADN y proteínas.

Por otro lado, existen estudios acerca de los efectos de los campos electromagnéticos sobre protozoarios. Ripamonti *et al.*, (1981) expusieron a *Spirotomum ambiguum* a un

campo magnético homogéneo estático de 12.5 T, para evaluar el efecto sobre la sobrevivencia del protozoario previamente expuesto al agente tóxico 2,2 dipiridil disulfuro. Ellos encontraron que en los protozoarios tratados con el campo magnético se disminuía significativamente su sobrevivencia, además de que se alargaba el ciclo celular, y ellos concluyen que el campo magnético con las características utilizadas, altera la regulación de los iones calcio a través de la membrana de este protozoario.

Dihel *et al.*, (1985) expusieron a *Paramecium* con un CEM pulsante de 72 Hz de frecuencia. Ellos observaron que dicho campo incrementa la división celular de *Paramecium* en un 8.5%, y sugieren que los campos electromagnéticos afectan el transporte de iones calcio a través de la membrana celular.

Más recientemente, Hemmersbach *et al.*, (1997), estudiaron el efecto de los CEM de 0.5-2.0 mT de 50 Hz sobre *Paramecium biaurelia, Loxodes striatus y Tetrahymena thermophila* y encontraron que se afectaba la velocidad de nado y una disminución en la dirección lineal en las células nativas. Sin embargo cuando se manejaba la mutante de *Paramecium tetraurelia* (se caracteriza por ser defectuosa en los canales de calcio), no se observaba cambio en movimiento del mismo. Estos resultados indican un efecto directo de los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia sobre los mecanismos de transporte de iones en la membrana celular que controlan la actividad motil del ciliado.

**5.4 Campos Electromagnéticos y Cáncer**

En varios estudios epidemiológicos se ha correlacionado la exposición de los humanos a campos electromagnéticos con una alta incidencia de cáncer (Coleman *et al.*, 1983; McDowall, 1983; Milham, 1982, 1985; Pearce *et al.*, 1988; Tomenius *et al.*, 1982; Wertheimer y Leeper, 1979; Wright *et al.*, 1982; Blackman *et al.*, 1988; Liburdy, 1992). Desde finales de los años 70's se comenzó a presentar evidencia epidemiológica que indicaba un posible incremento en la frecuencia de varios tipos de cáncer, principalmente leucemia, cáncer de mama y tumores cerebrales debido a la exposición a CEM generados por vías de abastecimiento eléctrico (Schreiber *et al.*, 1993).

Por su parte, Perry (1994) encontró que cuando se expusieron cultivos de células cancerosas a campos magnéticos, se presentaba un aceleramiento significativo en el crecimiento celular, el cual continuaba a una tasa rápida aún después de la exposición al campo magnético. Asimismo en ratas en las que se indujo la formación de tumores mamarios químicamente, se encontró que presentaban un grado mayor de crecimiento de tumor cuando se exponían a campos magnéticos de baja frecuencia.

Por otro lado, se ha sugerido que el riesgo de leucemia infantil puede estar relacionado con los efectos combinados de campos magnéticos estáticos y de campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja. También se han realizado estudios epidemiológicos que han demostrado el incremento del riesgo a padecer leucemia en niños que viven cerca de líneas de distribución eléctrica (Bowman *et al.*, 1995; Blank, 1995; Fajardo-Gutiérrez *et al.*, 1993).

También Antonopoulos *et al.*, (1995) han sugerido que los CEM tienen relación con el cáncer, para esto, ellos incubaron cultivos de sangre periférica en presencia de un CEM de 5 mT y 50 Hz de frecuencia. Los resultados obtenidos indicaron que los efectos carcinogénicos originados por CEM no son de tipo iniciador, pero probablemente tengan efectos promotores.

**5.5 Efectos de los CEM sobre la Expresión Génica**

Libertin *et al.*, (1994) evaluaron el efecto de los rayos gama, luz ultravioleta, luz solar, microondas y CEM sobre la expresión génica mediada por un promotor de un virus de inmunodeficiencia. Ellos utilizaron células HeLa que fueron transfectadas con un vector que contenía el gen que expresa la enzima cloramfenicol acetil transferasa, el cual era regulado por el promotor HIV-LTR. Ellos encontraron que la luz ultravioleta y la radiación de microondas afectaban la activación del promotor HIV-LTR. Sin embargo la exposición a rayos gama, luz solar ó CEM no afectaba la expresión. Por lo cual concluyeron que no todos los tipos de radiaciones son capaces de afectar la expresión de este promotor.

Por otra parte, en 1995 Saffer y Thurston expusieron células Daudi y HL60 humanas a CEM con un rango desde 5.7 μT hasta 10 mT de 60 Hz de frecuencia por 20 y 60 minutos, para evaluar la expresión del gen MYC. Ellos encontraron por medio de PCR, que los CEM de frecuencia extremadamente baja no inducen cambios significativos en la expresión del gen.

Otros resultados similares fueron obtenidos por Balcer-Kubiczek *et al.*, (1996).Ellos evaluaron el efecto de los CEM sobre la expresión de gen de la ornitin descarboxilasa.

Para lo cual expusieron por 24 horas células de embrión de hámster sirio y fibroblastos de ratón C3H/10T1/2 a CEM de 200 μT de 60 Hz. No encontraron efectos de los CEM sobre la expresión de esta enzima en estas células. Por otra parte se han obtenido resultados similares en otros estudios recientes (Shi *et al.*, 2003; Luceri *et al.*, 2005).

Por otra parte, en otro trabajo (Grimaldi *et al.*, 1997) expusieron a la línea celular humana Akata previamente infectada con el virus de Epstein-Barr (EBV) a un CEM de 50 Hz. Ellos encontraron un incremento en el número de células que presentaban de manera temprana antígenos de EBV. Por lo cual concluyeron que el CEM puede ser un modulador de la expresión génica.

Sin embargo Lin *et al.*, (1997) obtuvieron resultados distintos. Ellos determinaron el efecto de los CEM sobre la expresión de los genes de choque térmico en células humanas. Para esto expusieron células HL60 a CEM de 60 Hz bajo temperaturas de crecimiento normales. Se encontró incrementada la trascripción del gen hsp70, además de un aumento en la síntesis de la proteína HSP70, y por esto concluyeron que los CEM estimulan la producción de proteínas de estrés de manera similar a otros factores de estrés fisiológicos.

En otro trabajo realizado también por Lin *et al.*, (1998) se investigó la posible participación de elementos genéticos adicionales sobre la expresión de HSP70 inducida por campos magnéticos. Se evaluó la exposición a campos magnéticos y al choque térmico sobre la unión ADN—proteína de los factores de trascripción HSF, AP-1, AP2 y SP1 en cuatro líneas celulares. Los sitios de trascripción para estos factores están

localizados en el promotor HSP70. La actividad de AP-1 no se incrementó por el choque térmico, sin embargo sí se incrementó con el campo magnético. Se encontró además que el choque térmico solo inducía la unión de HSF. Ellos concluyen que los campos magnéticos inducen la trascripción de HSP70 y que hay un posible mecanismo de los campos magnéticos directamente con el ADN porque los campos magnéticos penetran a la célula y pueden interactuar con los electrones presentes en las bases nitrogenadas del ADN.

Por otra parte, Jahreis *et al.*, (1998) evaluaron el efecto de los CEM de 0.1 mT de 60 Hz sobre la expresión de los oncogenes c-fos, c-jun y c-myc. Para tal fin se expusieron células CEM-CM3 a CEM generados por bobinas de Helmholtz por períodos de tiempo de 15, 30, 60 y 120 minutos, para posteriormente extraer el núcleo y ARN citoplasmático. No encontraron diferencia en los niveles de trascripción de estos oncogenes entre el grupo expuesto al CEM y el grupo control.

Otro trabajo interesante es el realizado por Campbell-Beachler *et al.*, en 1998 en células PC12 de ratón estimuladas con el factor de crecimiento nervioso (NGF), en donde evaluaron el efecto de los CEM de 60 Hz sobre la expresión de c-fos. Ellos expusieron estas células al NGF, a las concentraciones de 2,4,8 y 16 ng/ml, para luego exponerlas a CEM de 12.5, 25,50 y 100 μT por 30 minutos. Posteriormente determinaron los niveles de trascripción de c-fos mediante el análisis de Northern blot usando sondas marcadas con $P^{32}$. No encontraron cambios en la expresión de este gen. Sin embargo cuando expusieron las células a una combinación de agentes químicos (NGF, fosfocolina y acetato de tetradecanoforbol [TPA]) y posteriormente al CEM,

encontraron que se incrementaba al doble la expresión de c-fos comparado con el grupo control no expuesto al CEM y concluyen que la exposición de células previamente tratadas con los agentes NGF, fosfocolina y TPA juntos y expuestas posteriormente a CEM presentaron un incremento en la expresión de c-fos.

Por su parte, Cairo *et al.*, (1998), determinaron el efecto de los CEM de frecuencia extremadamente baja sobre la expresión de ARN mensajero de sigma 32 en *Escherichia coli.* Ellos expusieron esta bacteria a CEM de 1.1 mT de 60 Hz por un tiempo de 15 minutos, y encontraron que las intensidades utilizadas incrementaron los niveles intracelulares de ARN mensajero.

En otro trabajo, (Tsuchiya *et al.*, 1998), se determinó el efecto de los campos magnéticos sobre la actividad transcripcional de *E. coli.* Los investigadores expusieron a la bacteria a un campo magnético que variaba entre 5.2 y 6.2 Teslas y que era producido por medio de magnetos superconductores, y encontraron que el crecimiento se incrementó 3 veces en la fase estacionaria comparado con el grupo control. Después se expuso al campo magnético una cepa de *E. coli* defectuosa en el gen rpoS, el cual codifica para el factor sigma y observaron la sobrevivencia en la fase estacionaria disminuida. Posteriormente se utilizo una cepa de *E. coli* que contenía una fusión rpoS-lacZ, para después exponer al campo magnético, observándose un incremento en la actividad de la β-galactosidasa. Con base a estos resultados concluyen que el campo magnético utilizado incrementa la actividad transcripcional en la fase estacionaria, así como un aumento de sobrevivencia celular.

Por otro lado, Tuinstra *et al.*, (1998) examinaron el efecto de los CEM de 1.5 mT de 60 Hz y el ester de forbol sobre la proteína quinasa C. Ellos probaron el efecto de estos factores solos y de manera combinada, y realizaron 2 experimentos. En el primero expusieron cultivos celulares a CEM y forbol 12-miristrato, 13 acetato (PMA) a una concentración de 2 μM y a la combinación de estos factores por 1 hora y no encontraron incremento en la actividad de la proteína quinasa C. En el segundo experimento, las células fueron previamente expuestas a una dosis menor a la óptima de PMA (50 nM) por 45 minutos, para posteriormente exponer tanto al CEM como al PMA por 15 minutos. Los datos indicaron una disminución en la actividad de la quinasa C a nivel citoplásmico y un aumento de actividad a nivel de membrana celular. Ellos sugieren que los CEM actúan de manera sinérgica sobre una vía que está siendo activada.

En otro trabajo realizado por Lagroye y Poncy (1998) se determinó el efecto combinado de los CEM de 50 Hz y la radiación ionizante sobre la expresión de c-fos y c-jun. En este trabajo se expusieron células de epitelio traqueal y otras 2 líneas celulares inmortalizadas, a los siguientes tratamientos: a) CEM de 0.1 mT de 50 Hz combinado con radiación gamma producida por $^{60}Co$ b) solo CEM de 0.1 mT y c) exposición únicamente de radiación gamma. Los resultados que obtuvieron fueron un incremento en la expresión de c-fos cuando se trataba únicamente con CEM o radiación ionizante. Sin embargo no se encontró efecto sinérgico al utilizar ambos factores. Se concluye que el CEM puede ser considerado como un agente capaz de afectar la expresión génica a nivel celular.

Por su parte, Han *et al.*, (1998) expusieron células humanas de mama normal (HTB124) a campos magnéticos de 60 Hz y examinaron los niveles de la proteína hsp70 después de la exposición, en este trabajo utilizaron 3 tratamientos: a) exposición contínua a CEM por 3 horas, b) exposición por 20 minutos y c) exposiciones repetidas a CEM con duración de 20 minutos con diferente dirección del campo magnético. Los resultados obtenidos indicaron que en el tratamiento de 3 horas contínuas a los 20 minutos iniciales, se presentaban niveles de hsp70 hasta de un 46%, sin embargo conforme pasaba el tiempo disminuían los niveles. Cuando se exponía solo por 20 minutos los valores se mantenían altos por más de 3 horas. Cuando las células se expusieron repetidamente a intensidades de 20 minutos los niveles de hsp70 fueron continuamente más elevados que el grupo control.

En otro trabajo elaborado por Lin *et al.*, (1999) se determinó cual era el sitio de respuesta del promotor HSP70 a campos magnéticos. Ellos encontraron que la expresión del gen HSP70 por campos magnéticos es afectada a nivel de la trascripción y es mediada por la unión de la proteína c-myc a dos secuencias nCTCTn localizadas entre –230 y –160. Por otra parte ellos informan otro sitio de unión de c-myc (entre –158 y –162) el cual es un importante regulador de la expresión de HSP70 inducida por campo magnético. Además, encontraron que el elemento de choque térmico, localizado entre –180 y -203 es requerido para la inducción de la expresión génica de HSP70 por campos magnéticos.

Por otra parte, Miller *et al.*, (1999) evaluaron el efecto de los CEM de 0.08, 0.1, 1.0 y 1.3 mT de 60 Hz sobre la expresión de los genes NF-kappaB y AP-1 en una línea de

células promonocíticas de leucemia humana. Ellos encontraron que las intensidades magnéticas utilizadas no tienen efecto sobre la expresión de los genes NF-kappaB y AP.

En un estudio realizado en 1999 (Loberg *et al.*) se determinó si existía relación entre los campos magnéticos y la expresión génica de genes humanos relacionados con cáncer de epitelio de mama, éstos son C-erb, B-2, p53, p21, GADD45, bax, bcl-x, mcl y c-fos . Para esto evaluaron el efecto de campos magnéticos de 60 Hz de frecuencia a las intensidades de 0.01, 0.1 y 1.0 mT en células HBL-100 por períodos de 20 minutos hasta por 24 horas, dichos grupos iban emparejados con un grupo control que estuvo expuesto solamente a campos magnéticos ambientales (<0.0001 mT). Los resultados obtenidos no mostraron una alteración de la expresión génica provocada por campos magnéticos por lo cual concluyen que estos campos no tienen relación con la influencia de inducción de cáncer de mama mediante el mecanismo de expresión de estos genes.

Hallazgos similares a los anteriores fueron obtenidos por Morehouse y Owen (2000a). Su objetivo era determinar si existe una relación entre campos electromagnéticos y el cáncer: Ellos evaluaron el efecto de los campos magnéticos de 60 Hz de 6.3 a 8.0 μT sobre la línea celular HL60, los resultados obtenidos fueron comparados con un control positivo de choque térmico de 42 a 44°C, y no encontraron efecto de los campos magnéticos sobre la expresión de HSP70.

En un estudio reciente (Pipkin *et al.*, 1999) se determinó el efecto de los campos magnéticos sobre la expresión de proteínas de estrés. Para esto, un cultivo de células HL60 fue expuesto por 2 horas a un campo magnético sinusoidal de 0.1 a 1 mT de 60 Hz de frecuencia para su posterior marcaje mediante isótopos radiactivos. Los marcadores

radiactivos fueron incorporados en las proteínas celulares por síntesis o fosforilación. Las proteínas fueron obtenidas electrostáticamente y las proteínas de choque térmico fueron analizadas por síntesis y fosforilación en gel bidimensional de poliacrilamida. Los resultados obtenidos no indicaron diferencia estadística entre el grupo expuesto al campo magnético de 0.1 mT y el grupo control; sin embargo si se encontró un incremento significativo en las proteínas de choque térmico en el grupo expuesto a campos magnéticos de 1.0 mT y el grupo control. Por esto los autores concluyen que el campo magnético de 1.0 mT interactúa en el nivel celular para inducir proteínas de estrés.

Por otra parte Miki *et al.,* (1999) investigaron los efectos de los campos magnéticos sobre la síntesis de ARN en un sistema libre de células. Se utilizo una mezcla de trascripción la cual contenía el ADN del promotor intermedio de CMV además de extractos nucleares de células HeLa. La mezcla de reacción se expuso a campos magnéticos a las intensidades de 10, 50 y 100 μT. Cada grupo expuesto fue emparejado con un grupo control no expuesto a dicho factor. Los resultados obtenidos no mostraron diferencia en la síntesis de ARN entre los grupos expuestos a campos magnéticos y el grupo control.

Otro trabajo similar fue el obtenido por un grupo de investigadores que determinaron el efecto de un campo magnético de 8 μT de 50 Hz de frecuencia por 20 minutos sobre la expresión génica de HSP70a, en larvas de *Drosophila sp* utilizando slot blot. Los resultados indicaron que los campos magnéticos de muy baja frecuencia provocan disminución en los niveles de transcripción. Por lo cual los investigadores sugieren que

estas respuestas experimentales pueden ser influenciadas por una exposición previa o carecer de exposición previa (Tipping *et al.*, 1999).

En un estudio (Morehouse y Owen, 2000b) determinaron el efecto de los campos magnéticos sobre la expresión del gen MYC en células Daudi. Para lo cual dichas células fueron expuestas a campos magnéticos de 60 Hz de intensidades de 12.5, 50, 100 y 500 μT por 20, 40 y 60 minutos, todos los tratamientos iban emparejados de un grupo control no expuesto a dicho factor físico. La expresión de MYC fue determinada mediante la técnica de hibridación de northern blot. Los resultados obtenidos indicaron que los campos magnéticos no alteran de manera significativa la expresión de MYC en células Daudi.

Por otro lado, Ventura *et al.*, (2000) evaluaron el efecto de los campos magnéticos de frecuencia extremada baja sobre la expresión de genes de opioides. Ellos expusieron miocitos de rata a campos magnéticos y determinaron la expresión del gen de la prodinorfina. Los resultados obtenidos indican que los campos magnéticos son capaces de incrementar la síntesis y secreción de prodinorfina en una célula intacta, por lo cual concluyen que el gen opioide de células de células de miocito es activado por la exposición a campos magnéticos.

En este mismo año, Romano *et al.*, (2000) determinaron el efecto de los CEM de 50 Hz sobre la expresión del oncogen *ets1*. Para lo cual analizaron dicha expresión en células hematopoyéticas y testiculares. Se encontró sobreexpresión del ARNm de *ets1* a la intensidad de 45.7 μT en células Jurkat linfoblastoide y en células TM3 Leydig. Por lo que concluyen que los CEM son capaces de inducir la expresión génica.

Más recientemente (Di Carlo *et al.*, 2002) expusieron embriones de pollo con CEM de muy baja frecuencia, para determinar si se afectaba la protección contra hipoxia además de los niveles de Hsp70, utilizando como base experimentos previos. Expusieron embriones de pollo a CEM de 8 μT por 4 días de forma contínua o de manera repetida en períodos de 20, 30 o 60 minutos 1 o 2 veces al día. Encontraron que cuando se expone de manera continua, los embriones disminuían los niveles de Hsp70 en comparación con un grupo control, además se observó una disminución en la protección contra el estrés hipóxico. Por esto concluyen que la exposición a CEM durante periodos prolongados provoca una disminución en los niveles de Hsp70 y afecta también la citoprotección.

Además, en un estudio reciente (Tokalov y Gutzeit, 2004) se pretendió demostrar si los genes de choque térmico en las células humanas podían responder a CEM solos y en la combinación con estrés térmico. Después de exponer células HL-60 por 30 minutos con CEM de 10 hasta 140 μT, ellos cuantificaron la expresión de los genes HSP27, HSP60, HSP70 (A, B, y C), HSC70, HSP75, HSP78, y HSP90 por RT-PCR. Los resultados mostraron que los genes de choque térmico, en particular los tres genes de HSP70 (A, B, y C), son inducidos por CEM, estos resultados fueron reforzados por exposición tanto a CEM como choque térmico. La respuesta a CEM mostró un máximo a una densidad de flujo magnético de 60-80 μT.

Por otro lado, aparte de la identificación de elementos de respuesta a CEM en el gen hsp70, recientemente un grupo asiático clonó e identificó genes de respuesta a CEM en células Daudi (Wu *et al.*, 2000). Ellos utilizaron el ARN total aislado de células

expuestas a 0.8 mT de 50 Hz de frecuencia además de células no expuestas a dicho factor; y encontraron diferencias en la regulación de trascripto entre las células expuestas a CEM y el grupo control utilizando la tecnología de visión diferencial, además el patrón de transcripto se verificó mediante el análisis de Northern-blot y Northern-blot en reversa. El análisis de secuencia de ADN demostró que el fragmento de cDNA es un nuevo gen en células humanas que puede ser inducido por CEM.