

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**EFFECTOS BIOLÓGICOS DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE
MUY BAJA FRECUENCIA Y RADIOFRECUENCIA EN
PRESENCIA DE METALES PESADOS: CADMIO Y
MERCURIO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Olga García Arribas

Bajo la dirección del doctor

Bartolomé Ribas Ozonas

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1822-1

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

**EFFECTOS BIOLÓGICOS DE CAMPOS
MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA Y
DE RADIOFRECUENCIA EN PRESENCIA DE
METALES PESADOS: CADMIO Y MERCURIO**

TESIS DOCTORAL

OLGA GARCÍA ARRIBAS

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, MADRID
CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AMBIENTAL
Departamento de Toxicología

Madrid, 2002

D. BARTOLOMÉ RIBAS OZONAS, Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral **“EFECTOS BIOLÓGICOS DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA Y DE RADIOFRECUENCIA EN PRESENCIA DE METALES PESADOS: CADMIO Y MERCURIO”**, realizada por **Dña. OLGA GARCÍA ARRIBAS** bajo mi dirección, en el Área de Toxicología Ambiental del Centro Nacional de Sanidad Ambiental, perteneciente al Instituto de Salud Carlos III de Madrid, tiene la originalidad y calidad necesarias para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Madrid, a 15 de febrero de 2002

El Director de la Tesis:

Fdo: D. Bartolomé Ribas Ozonas

Doctorando

Fdo: Dña. Olga García Arribas

La Dra. ANA MARTÍNEZ DÍAZ

Profesora Titular de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: **“EFECTOS BIOLÓGICOS DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA Y DE RADIOFRECUENCIA EN PRESENCIA DE METALES PESADOS: CADMIO Y MERCURIO”**, presentado por **Dña. OLGA GARCÍA ARRIBAS** para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, realizado bajo la dirección del Doctor Bartolomé Ribas Ozonas, reúne los requisitos formales, científicos y metodológicos suficientes para su presentación y defensa como Tesis Doctoral ante un Tribunal.

Madrid, a 18 de febrero de 2002

Dra. Ana Martínez Díaz

Tutora de la Tesis Doctoral

El presente trabajo ha sido financiado a través de proyectos de la Comunidad Autónoma de Madrid 08.8/0002/97 y del Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 0050-02/98 concedidos al Área de Toxicología Ambiental y por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador del Instituto de Salud Carlos III a la doctoranda.

A mi familia

Quisiera expresar mi agradecimiento:

A mi Director de Tesis Doctoral, el Jefe de Área de Toxicología Ambiental, del Centro Nacional de Sanidad Ambiental, del Instituto de Salud Carlos III, Dr. Don Bartolomé Ribas Ozonas, por su inestimable ayuda y por su constante apoyo y dedicación durante estos años.

Al Director del Departamento de Física Aplicada III, de la Facultad de Física de la Universidad Complutense de Madrid, Don Jose Luis Sebastián Franco por el diseño del sistema y construcción de la cámara de campos magnéticos utilizada en el trabajo experimental, la realización de parte del trabajo sobre radiofrecuencia en su Departamento, así como a los miembros del equipo que han firmado los trabajos publicados en colaboración, siendo uno de ellos premiado por la Unión Internacional de Radio-Ciencia (URSI).

Al profesor Manuel Vázquez Villalabeitia, del Instituto de Ciencias de los Materiales, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por proporcionar al Dr. B. Ribas, la segunda cámara de campos magnéticos, utilizada en los trabajos aquí presentados.

A mi tutora, la profesora Dña. Ana Martínez Díaz por su interés y amabilidad.

A Josefa Pérez Álvarez responsable Veterinaria del Criadero y de Experimentación Animal, y especialmente a Lucinio Millán Pérez por su valiosa ayuda, sin la cual no hubiera sido posible la realización de varios experimentos realizados en esta memoria y por su amistad.

Al Doctor Don José Manuel Escribano por su contribución en la realización de los análisis sanguíneos, realizados en el Instituto de Cardiología de la Comunidad de Madrid.

A Javier Moreno por su ayuda desinteresada, sus buenos consejos y por su amabilidad y simpatía.

A mis compañeras Mar Pérez Calvo, María Gutierrez Morcillo y especialmente a Noelia Padilla Mariblanca por haberme prestado su ayuda siempre que lo he necesitado y por su amistad y estímulos constantes.

A Estrella Bouza Sixto por sus buenos consejos, su apoyo constante y por el interés y cariño que demuestra hacia mi persona.

Por último, a mi familia y a todas las personas con las que he compartido este tiempo, muchísimas gracias por haberme apoyado fuera del trabajo y haberme animado a seguir adelante. Sin vosotros no habría podido llegar hasta aquí.

ABREVIATURAS

A = Amperio
μA = Microamperio
ACGIH = American Conference of Government Industrial Hygienists
AM = Onda media
ATP = Adenina trifosfato
ATSDR = Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BHE = Barrera hematoencefálica
Cd = Cadmio
CEM = Campos electromagnéticos
CM = Campos magnéticos
CM-MBF = Campos magnéticos de muy baja frecuencia
CIPRNI = Comisión Internacional para la Protección de Radiaciones No Ionizantes.
CUE = Consejo de la Unión Europea
CPK = Creatina fosfoquinasa
cpm = cuentas por minuto
cps = cuentas por segundo
DNA = Ácido desoxiribonucleico
D.O. = Densidad óptica
ε = Permitividad
EC = European Commission
FA = Fosfatasa alcalina
FM = Frecuencia modulada
G = Gauss
GHz = Gigahertzios
GOT = Clutámico oxalacético transaminasa
GPT = Glutámico pirúvico transaminasa
γ-GTP = γ-Glutamiltranspeptidasa
GP = Glándula pineal
GSH = Glutation
Hz = Herzios
IARC = International Agency Research Cancer
ICP-MS = Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IEEE = Institute of Electrical and Electronic Engineers
IRPA = International Radiation Protection Association
H / h = Horas
Hg = Mercurio
HP. HFSS = Hewlett Packard High Frequency Structure Simulator
LCR = Líquido cefalorraquídeo

LDH = Láctico deshidrogenasa
MEL = Melatonina
MeHg = Metilmercurio
min = minutos
MHz = Megahertzios
MTT = 3-4, 5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NR = Nivel de referencia
NRC = National Research Council
NRPB = National Radiological Protection Board
ODC = Ornitina decarboxilasa
Oe = Oersted
OECD = Organization for Economic Co-operation and Development.
OMS = Organización Mundial de la Salud
OSHA = Occupational Safety and Health Administration
PBS = Phosphate buffer solution
PHA = Fitohemaglutinina
PKC = Proteína kinasa C
RB = Restricción básica
ROS = Reactive Oxygen Species
RF = Radiofrecuencia
 σ = Conductividad
S = Siemens
SAR = Specific Absorption Rate (Tasa de absorción específica)
SNC = Sistema Nervioso Central
T = Tesla
 μT = microtesla
mT = militesla
UNEP = United Nations Environment Programme
UV = Ultravioleta
W = Watio
 μW = Microwatio
WHO = World Health Organization

TABLA DE EQUIVALENCIAS

CAMPOS MAGNÉTICOS DE 50 Hz Y DIVERSAS INTENSIDADES
UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

CAMPOS MAGNÉTICOS DE 50 Hz			
Amperios (A)	Militeslas (mT)	Gauss (G)	Oersted (Oe)
0,25	1,6	16	16
0,5	3,2	32	32
1	6,5	65	65
1,5	9,7	97	97

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. DESARROLLO TEÓRICO	11
II.1. VISIÓN GLOBAL DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS	11
II.1.1. <i>Introducción</i>	11
II.1.2. <i>Unidades de medida de los campos electromagnéticos</i>	21
II.1.3. <i>Normativa relativa a los campos electromagnéticos</i>	22
II.1.4. <i>Campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz)</i>	26
II.1.4.1. Mecanismo de interacción con la materia.....	26
II.1.4.2. Fuentes	28
II.1.4.3. Límites de exposición	31
II.1.4.4. Estudios epidemiológicos	35
II.1.4.5. Estudios experimentales	38
II.1.5. <i>Campos electromagnéticos de radiofrecuencia</i>	50
II.1.5.1. Mecanismo de interacción con la materia.....	50
II.1.5.2. Fuentes	52
II.1.5.3. Límites de exposición	56
II.1.5.4. Estudios epidemiológicos	60
II.1.5.5. Estudios experimentales	64

II.2. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	74
II.2.1. <i>Introducción. Características</i>	74
II.2.2. <i>Mecanismo de transporte</i>	79
II.2.3. <i>Barrera hematoencefalorraquídea</i>	86
II.3. IONES DE METALES PESADOS: CADMIO Y MERCURIO	88
II.3.1. <i>Cadmio</i>	91
II.3.1.1. <i>Introducción</i>	91
II.3.1.2. <i>Características. Aplicaciones. Fuentes</i>	92
II.3.1.3. <i>Exposición al cadmio</i>	95
II.3.1.4. <i>Metabolismo</i>	97
II.3.1.5. <i>Mecanismo de acción</i>	99
II.3.1.6. <i>Toxicidad del cadmio</i>	101
II.3.1.7. <i>Indicadores de la exposición a cadmio</i>	108
II.3.2. <i>Mercurio</i>	110
II.3.2.1. <i>Introducción</i>	110
II.3.2.2. <i>Características. Aplicaciones. Fuentes</i>	111
II.3.2.3. <i>Distribución, transporte y transformación en el medio</i>	113
II.3.2.4. <i>Mercurio elemental</i>	117
II.3.2.5. <i>Mercurio iónico</i>	119
II.3.2.6. <i>Metilmercurio</i>	125
II.3.2.7. <i>Evaluación del riesgo para la salud</i>	128
II.3.2.8. <i>Indicadores de la exposición a mercurio</i>	129
III. OBJETIVOS	131

IV. MATERIAL Y MÉTODOS	134
IV.1. APLICACIÓN DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50Hz)	134
<i>IV.1.1. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) en linfocitos. Posible sinergismo con metales pesados: cadmio y mercurio</i>	134
IV.1.1.1. Sistema de generación de campos magnéticos de 50 Hz e intensidad variable	134
IV.1.1.2. Obtención de linfocitos	138
IV.1.1.3. Optimización del tiempo de incubación en la cámara de campos electromagnéticos	140
IV.1.1.4. Cultivos celulares. Incubación de las células con diferentes concentraciones de iones cadmio y de mercurio	144
IV.1.1.5. Exposición a campos magnéticos de 50 Hz	147
IV.1.1.6. Identificación de daño genético mediante el ensayo de micronúcleos	148
IV.1.1.7. Determinación de proliferación celular mediante el ensayo con MTT	150
IV.1.1.8. Análisis estadístico	151
<i>IV.1.2. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) en sangre humana</i>	152
IV.1.2.1. Obtención de sangre humana	152
IV.1.2.2. Exposición a campos magnéticos de 50 Hz	152
IV.1.2.3. Determinación de parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo	153
IV.1.2.4. Análisis estadístico	164

IV.1.3. <i>Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratón</i>	165
IV.1.3.1. Sistema de generación de campos magnéticos de muy baja frecuencia 50 Hz y 27,5 G	165
IV.1.3.2. Animales. Tratamiento con mercurio	168
IV.1.3.3. Exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G.....	170
IV.1.3.4. Determinación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica mediante utilización de rojo neutro	171
IV.1.3.5. Análisis estadístico	173
IV.2. APLICACIÓN DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RADIOFRECUENCIA (2,45 GHz)	174
IV.2.1. <i>Campos electromagnéticos de radiofrecuencia (2,45 GHz) en ratas</i>	174
IV.2.1.1. Sistema experimental para la generación de campos electromagnéticos de radiofrecuencia a 2,45 GHz	175
IV.2.1.2. Animales	179
IV.2.1.3. Tratamiento con cadmio	180
IV.2.1.4. Tratamiento con mercurio	183
IV.2.1.5. Análisis de sangre	186
IV.2.1.6. Determinación de las propiedades eléctricas del tejido (permitividad y conductividad)	188
IV.2.1.7. Análisis de la concentración de metal en cada tejido mediante ICP-MS	190
IV.2.1.8. Análisis estadístico	194

V. RESULTADOS	196
V.1. CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz)	196
<i>V.1.1. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50Hz) e intensidades 0,5 A, 1 A y 1,5 A en linfocitos humanos. Estudio del efecto simultáneo de los campos magnéticos y la presencia de iones cadmio y mercurio</i>	196
V.1.1.1. Ensayo de micronúcleos en linfocitos sometidos a campos magnéticos de 50 Hz a las intensidades de 0,5 A, 1 A y 1,5 A en presencia de cadmio y de mercurio	196
V.1.1.2. Determinación de proliferación celular en linfocitos sometidos a campos magnéticos de 50 Hz a diferentes intensidades 0,5 A, 1 A y 1,5 A en presencia de cadmio y de mercurio	207
V.1.1.2.1. Campo magnético de 50 Hz y 0,5 A	209
V.1.1.2.2. Campo magnético de 50 Hz y 1 A	212
V.1.1.2.3. Campo magnético de 50 Hz y 1,5 A	215
V.1.1.2.4. Balance global de los resultados obtenidos	219
<i>V.1.2. Sangre humana sometida a campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y diferentes intensidades (0,25 A, 0,5 A y 1 A)</i>	224
V.1.2.1. Datos enzimáticos y bioquímicos en sangre tratada con campos magnéticos de 50 Hz e intensidad 0,25 A, 0,5 A y 1 A a diferentes tiempos de exposición	225
V.1.2.1.1. Campo magnético de 50 Hz y 0,25 A	226
V.1.2.1.2. Campo magnético de 50 Hz y 0,5 A	230
V.1.2.1.3. Campo magnético de 50 Hz y 1 A	235
V.1.2.2. Estudio comparativo de los datos bioquímicos y enzimáticos a las diferentes intensidades de campo magnético	239

V.1.3. <i>Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz y 27,5 G) en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratón. Efecto combinado de los campos magnéticos y sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la barrera</i>	243
V.1.3.1. Espectro de absorción del colorante vital rojo neutro	243
V.1.3.2. Determinación colorimétrica del rojo neutro en cerebro de ratón expuesto a campos magnéticos con y sin sobrecarga de mercurio	246
V.2. CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RADIOFRECUENCIA	251
V.2.1. <i>Aplicación de campos electromagnéticos de radiofrecuencia (2,45 GHz) en ratas</i>	251
V.2.1.1. Control analítico de los grupos de ratas tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio	251
V.2.1.2. Determinación de las propiedades eléctricas (Permitividad y Conductividad) en tejidos de ratas sometidas a tratamiento con sobrecarga de iones cadmio y de mercurio	255
V.2.1.3. Determinación de la concentración de metal en cada tejido mediante ICP-MS	270
V.2.1.3.1. Análisis de la concentración de cadmio	272
V.2.1.3.2. Análisis de la concentración de mercurio	274
VI. DISCUSIÓN	277
VI.1. CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz) Y SU POSIBLE SINERGISMO CON METALES PESADOS: CADMIO, MERCURIO EN CULTIVOS CELULARES DE LINFOCITOS HUMANOS	281

VI.2. EFECTOS DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz) EN SANGRE HUMANA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN	296
VI.3. MODIFICACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA POR LA ACCIÓN DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz) Y SOBRECARGA DE MERCURIO	304
VI.4. VARIACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE TEJIDOS ANIMALES SOMETIDOS A RADIOFRECUENCIA Y SOBRECARGA IONES: CADMIO Y MERCURIO	314
VII. CONCLUSIONES	326
VIII. BIBLIOGRAFÍA	332

I. INTRODUCCIÓN

Los campos electromagnéticos (CEM) forman parte de nuestra vida cotidiana, aunque en el desarrollo de los seres vivos y en sus procesos de adaptación al medio tan solo se han conocido como CEM externos aquellos que provienen de emisores naturales como el sol o el campo magnético terrestre. Los seres vivos son entes dinámicos y sus reacciones bioquímicas incluida la cadena de transporte electrónico inducen también CEM internos. Es de suponer, por tanto, que los seres vivos han adaptado sus estructuras a los campos electromagnéticos desde el punto de vista anatómico, funcional y bioquímico.

En el siglo pasado, debido al desarrollo industrial se han puesto en circulación una enorme cantidad de nuevas emisiones electromagnéticas con una gran variedad de frecuencias, para las que los seres vivos no estaban adaptados. Los tipos de energías electromagnéticas que más se han incrementado son los campos magnéticos de muy baja frecuencia, por la implantación de las líneas de alta tensión y el desarrollo de nuevos aparatos electrodomésticos; y las radiofrecuencias, por el incremento de los teléfonos

móviles y sus estaciones base, ubicadas en las azoteas de los edificios en las zonas urbanas y en torres a nivel del suelo en las zonas rurales.

Los campos electromagnéticos constituyen un tema de gran actualidad debido a la inquietud social despertada en relación con sus posibles efectos sobre la salud pública. Además existe una gran controversia debido a los numerosos intereses económicos que están en juego por parte de las empresas operadoras, tanto de energía eléctrica como del sector de las telecomunicaciones.

Hoy en día la información que poseemos sobre los efectos biológicos de radiaciones no ionizantes concretamente de los campos magnéticos de muy baja frecuencia y de radiofrecuencia es escasa e incompleta. Teniendo en cuenta esta carencia y sabiendo que existe una necesidad de establecer unos criterios adecuados de seguridad ante exposiciones a radiaciones no ionizantes de intensidad y duración variables, las autoridades sanitarias nacionales e internacionales han decidido formar comités de expertos en ingeniería, medicina, biología, química y física, para estudiar el problema de los campos electromagnéticos ambientales y sus posibles efectos. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) encargó a la Comisión Internacional de Protección contra las Radiaciones No Ionizantes (CIPRNI) la elaboración de unas normas para la protección de los ciudadanos ante las radiaciones no

ionizantes. Esta comisión publicó sus conclusiones en 1998. Un año después, el Consejo de la Unión Europea hizo suyos los criterios y conclusiones de la CIPRNI y promulgó un conjunto de recomendaciones para la protección del público en general ante las radiaciones no ionizantes (1999/419/CE, DOCE 1999).

El grupo de expertos de la CIPRNI después de llevar a cabo un estudio exhaustivo de la literatura científica concluyó que los efectos debidos a la exposición crónica a CEM no estaban correctamente establecidos, por eso los límites de exposición elaborados por la CIPRNI están basados en efectos inmediatos sobre la salud. Estos efectos son: shock y quemaduras provocados por contactos con objetos conductores, estimulación de nervios periféricos y músculos, y aumento de temperatura en los tejidos debido a la absorción de energía durante exposiciones a los campos electromagnéticos.

Por otro lado, la valoración de los posibles efectos de las radiaciones no ionizantes se debe hacer teniendo en cuenta que la identificación de una respuesta biológica no conlleva directamente la existencia de un efecto nocivo para la salud.

Los campos magnéticos de frecuencia 50 Hz (Europa) o 60 Hz (Estados Unidos) denominados también campos magnéticos de muy baja

frecuencia (CM-MBF), son objeto de polémica científica y social debido a los potenciales perjuicios sobre la salud de las líneas de alta tensión y de tendidos eléctricos de menor envergadura situados próximos a las viviendas. Por ello se han realizado varios tipos de estudios para determinar su posible efecto nocivo sobre los seres vivos (Ribas y col. 2000a).

Los datos epidemiológicos sobre efectos cancerígenos y mutagénicos de los campos magnéticos de 50 Hz o 60 Hz proporcionan resultados diversos y a veces contradictorios. Los estudios epidemiológicos comenzaron con Wertheimer y Leeper (1979) que describieron un aumento de leucemias en familias que vivían junto a conducciones eléctricas, aunque posteriormente Fulton y col. (1980) no encontraron incremento alguno. Tomenius (1986) observó dos veces más tumores del sistema nervioso central en personas expuestas a campos de 50 Hz.

En los cinco últimos años se han publicado nuevos trabajos que muestran una relación entre la leucemia infantil y la del adulto, así como otros cánceres infantiles con la exposición a CM de 50 ó 60 Hz, (Floderus y col. 1993, Feychting y Ahlbom 1993, Olsen y col. 1993 Verkasalo y col. 1993) aunque estos estudios no tuvieron en cuenta los numerosos parámetros fisiológicos y epidemiológicos necesarios para justificar con claridad sus conclusiones. Linet y col. en 1997 realizaron una revisión muy amplia sin

conseguir demostrar una relación entre leucemia infantil y exposición residencial a CM de 50 Hz. En dos trabajos recientes (Ahlbom y col. 2000, Greenland y col. 2000) se evaluaron los estudios publicados sobre leucemia en niños y CM de 50 Hz. En ambos análisis se detectó un aumento del riesgo de cáncer con el nivel más alto de exposición (0,3 - 0,4 μ Tesla), sin embargo no se observó ningún efecto con niveles de exposición más bajos. De ambos análisis se deduce que son necesarios más estudios en poblaciones altamente expuestas para determinar la asociación entre campos magnéticos de muy baja frecuencia y leucemia infantil.

En lo concerniente a la exposición ocupacional a CM-MBF, varios estudios epidemiológicos sugieren una relación entre estos campos y el riesgo de ciertos tipos de cáncer como leucemia, tumores en el sistema nervioso central y cáncer de mama, sin embargo en otros estudios no se observó ninguna asociación. La metodología empleada en muchos de estos trabajos es objeto de crítica debido a una ausencia de dosimetría de campos para dichos trabajadores, por ello la CIPRNI entiende que la evidencia existente sobre incidencia de cáncer en trabajadores expuestos es limitada e insuficiente.

En cuanto a los efectos genotóxicos de los CM de muy baja frecuencia, las revisiones realizadas por Murphy y col. 1993, Mc Cann y col. 1993, 1998, 2000 concluyen que existe una evidencia de que los CM-MBF no tienen

potencial genotóxico. Sin embargo también aparecen estudios con resultados positivos, que deberían ser confirmados por una replicación independiente. De estas revisiones y de la literatura científica disponible se deduce la dificultad de establecer conclusiones serias y fiables de la comparación entre los diferentes trabajos, por los diferentes ensayos, metodologías, células y organismos de experimentación utilizados.

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre diferentes sistemas biológicos con objeto de valorar experimentalmente la carcinogenicidad de las exposiciones a campos magnéticos de muy baja frecuencia. La CIPRNI en base a la revisión de esta literatura, concluye que no existe por el momento evidencia “convinciente” de efectos cancerígenos por la exposición a CM-MBF y que son necesarios más estudios sobre modelos animales para clarificar los posibles efectos de estos campos sobre las señales celulares y la regulación neuroendocrina, factores que pueden influir en el desarrollo de tumores a través de la promoción de la división celular.

Por otra parte, los campos electromagnéticos de radiofrecuencia utilizados actualmente se hallan comprendidos en el rango de 100 kHz a 300 GHz. El rápido desarrollo y la extensión del uso de las radiofrecuencias como un nuevo elemento que forma parte de nuestra vida cotidiana es hoy un hecho incuestionable. Pero la puesta en uso de forma masiva de estos nuevos

medios, donde ocupan un lugar destacado los teléfonos móviles con sus indudables ventajas sociales así como el creciente número de estaciones base imprescindibles para una telefonía móvil de calidad, no se ha realizado con los debidos controles sobre los efectos que la exposición a radiofrecuencia pueda tener sobre los seres vivos (Ribas y col. 2000b).

En España recientemente se ha firmado el RD 1066/2001 de 28 de septiembre por el que se aprueba el reglamento que tiene entre otros objetivos, adoptar medidas de protección sanitaria frente a las instalaciones radioeléctricas. Para ello, se han establecido unos límites de exposición del público en general a campos electromagnéticos procedentes de fuentes de radiofrecuencia, acordes con las recomendaciones europeas (CIPRNI).

En lo relativo a los estudios epidemiológicos sobre radiofrecuencia, revisiones recientes de Moulder y col. (1999), Elwood y col. (1999) no sugieren una asociación causal entre cáncer y radiofrecuencia, sin embargo estos estudios son escasos y todos ellos presentan deficiencias en la cuantificación de la exposición. Hacen falta nuevos estudios que midan los posibles efectos de una exposición crónica a radiofrecuencia con una metodología más controlada, hasta ahora los resultados obtenidos no son concluyentes.

Por otro lado, los datos experimentales sobre radiofrecuencia disponibles actualmente indican que, por debajo de los niveles a que se dan efectos térmicos, las radiofrecuencias no generan respuestas genotóxicas y no influyen en la iniciación de cáncer. Los estudios que sugieren una posible acción cancerígena o de influencia en procesos de promoción o progresión tumoral están poco controlados y son demasiado escasos para constituir un bloque de evidencia firme. Se han realizado también estudios con animales sometidos a radiofrecuencia y se ha especulado sobre potenciales alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en exposiciones prolongadas. Estos estudios requieren replicación independiente y deben ser ampliados.

En lo referente al teléfono móvil, la exposición del público a sus radiaciones típicas es relativamente reciente, pero ya se han realizado varios estudios epidemiológicos con personas aquejadas de dolores de cabeza por el uso de los mismos, aunque de momento no hay datos suficientes para evaluar correctamente sus posibles efectos nocivos sobre la salud (Frey 1998, Mild 1998). Según varias investigaciones recientes, el uso de los teléfonos móviles no está asociado con un riesgo de cáncer cerebral, sin embargo algunos de estos estudios presentan deficiencias en la cuantificación de la exposición. Son necesarios nuevos estudios, durante varios años, para evaluar el riesgo en

personas que los utilizan con mucha frecuencia (Hardell y col 1999, Muscat 2000, Inskip y col. 2001).

En general, en el abordaje del estudio tanto de los campos magnéticos de muy baja frecuencia como los de radiofrecuencia se debería determinar la relación causa-efecto y establecer una metodología de trabajo que permita controlar con precisión los resultados para que no aparezcan, como sucede en la actualidad, una variedad de efectos, en muchas ocasiones de forma contradictoria, que lejos de establecer un criterio y normas de control lo que consiguen es generar confusión.

La profundización en la investigación de respuestas biológicas a radiaciones no ionizantes es considerada una tarea prioritaria (Repacholi 1998). En efecto, la ampliación de nuestros conocimientos en dicha materia permitiría el establecimiento de niveles de seguridad más precisos. Esto contribuiría a evitar la aparición de fobias, que aunque carezcan de base firme, generan inseguridad en los ciudadanos y originan desconfianza hacia las compañías eléctricas y del sector de las comunicaciones y hacia los organismos responsables de protección radiológica.

El Parlamento Europeo aconseja un programa específico de investigación experimental sobre el efecto de los campos electromagnéticos

en la salud humana. Considera además que deben estudiarse fenómenos de sinergia entre los efectos de radiaciones no ionizantes y los debidos a contaminantes químicos ambientales (DOCE N° C 205/440 1994).

La presente memoria se encuadra dentro de las investigaciones sobre los campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y de radiofrecuencia. Siguiendo las recomendaciones del Parlamento Europeo se pretende estudiar el efecto biológico de estos campos electromagnéticos y su posible sinergismo con dos contaminantes químicos ambientales: los metales pesados cadmio y mercurio, ambos presentes en el medio natural debido a las actividades industriales.

II. DESARROLLO TEÓRICO

II.1. VISIÓN GLOBAL DE LOS CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS.

II.1.1. Introducción

La electricidad y el magnetismo se consideraron hasta principios del siglo XIX como manifestaciones distintas de la naturaleza ligadas respectivamente a las cargas eléctricas y a los imanes. La historia inicial del electromagnetismo es, por tanto, la de estas disciplinas.

El experimento de Oersted de 1819, las aportaciones de Ampère y el descubrimiento de la inducción por Faraday establecieron que el magnetismo es una manifestación ligada a las corrientes eléctricas, es decir a las cargas en movimiento.

Finalmente, hacia 1860 Maxwell propuso las ecuaciones que llevan su nombre y que constituyen la síntesis definitiva de las dos teorías en un único formulismo, de él se desprendía la existencia de las ondas electromagnéticas, producidas y detectadas por Hertz alrededor de 1890.

Hoy en día sabemos que los campos electromagnéticos se dan de forma natural en el entorno, y nuestro organismo está habituado a convivir con ellos a lo largo de su existencia. Por ejemplo, en la Tierra existe un campo eléctrico natural producido por la diferencia de tensión entre la atmósfera y el suelo, normalmente su intensidad es de unos 0,15 kV/m. El movimiento de materiales magnéticos en el interior de la corteza terrestre crea un campo magnético natural que, entre otras cosas es el responsable de que la brújula apunte siempre hacia el norte, su valor oscila dependiendo de la posición en el globo terráqueo, situándose alrededor de 50 microteslas.

También son de origen natural los rayos infrarrojos y ultravioletas que emite el Sol, o los rayos X y gamma provenientes del espacio; incluso la propia luz visible que percibimos con los ojos es una onda electromagnética.

En general llamamos radiaciones electromagnéticas a ondas producidas por la oscilación de una carga eléctrica. Estas ondas electromagnéticas están formadas por componentes eléctricos y magnéticos ligados entre sí y presentan las propiedades típicas del movimiento ondulatorio, como la difracción y la interferencia. Todas las radiaciones electromagnéticas, independientemente de su frecuencia, se transmiten a la velocidad de la luz sin necesidad de un medio físico de propagación, por tanto pueden viajar en el vacío.

Las radiaciones electromagnéticas se pueden describir en función de dos parámetros: su longitud de onda y su frecuencia. Cuanto menor es la longitud de onda, mayor es la frecuencia y la energía transmitida por la onda electromagnética. Esquemáticamente se pueden representar estas ondas según la figura 1.

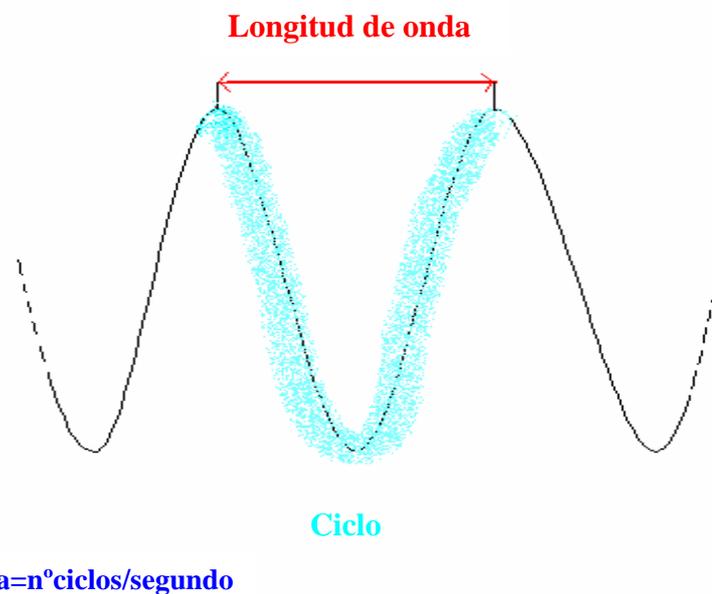


Figura 1. Onda electromagnética.

La frecuencia de la radiación es el número de ciclos por segundo. Se mide en una unidad llamada hercio, Hz, que equivale a un ciclo por segundo. La longitud de onda es la distancia entre dos máximos y se suele medir en nanómetros.

Otra característica de las radiaciones electromagnéticas es además de su frecuencia y longitud de onda, su energía. La energía se mide en electrón-voltio (la energía cinética que adquiere un electrón al ser acelerado por una diferencia de potencial de 1 voltio). Cuando una radiación interacciona con un medio material determinado produce unos efectos que serán tanto más importantes cuanto mayor sea la fuerza de impacto, es decir cuanto más energética sea la radiación.

Las radiaciones electromagnéticas según su energía se pueden clasificar en radiaciones ionizantes y no ionizantes. Las radiaciones ionizantes son las más energéticas porque tienen suficiente energía para arrancar electrones de las capas más externas de los átomos.

Los átomos ionizados, es decir aquellos a los que se les ha arrancado algún electrón, para recuperar su situación de estabilidad provocan reacciones químicas que, cuando afectan a las células del cuerpo humano, pueden significar algún tipo de riesgo para la salud. En concreto cuando las uniones químicas afectadas forman parte del material genético de las células este daño puede conducir, si no es reparado por el sistema, a genotoxicidad, cáncer o a defectos en el desarrollo en casos de irradiación durante la gestación.

Las radiaciones no ionizantes son menos energéticas, no pueden producir ionización ya que son demasiado débiles para romper uniones

químicas, y por tanto su interacción con los sistemas vivos es distinta a la descrita para las radiaciones ionizantes.

La cantidad de energía que una radiación electromagnética es capaz de depositar en un organismo, y la forma en que esta radiación es absorbida por el sujeto están determinadas por la frecuencia de la radiación incidente. En general, cuando la frecuencia aumenta, el poder de absorción de la radiación por parte de los tejidos aumenta y la penetración de la radiación disminuye.

En la figura 2 se representa el espectro electromagnético en el que se muestran los distintos tipos de radiaciones electromagnéticas según su frecuencia.

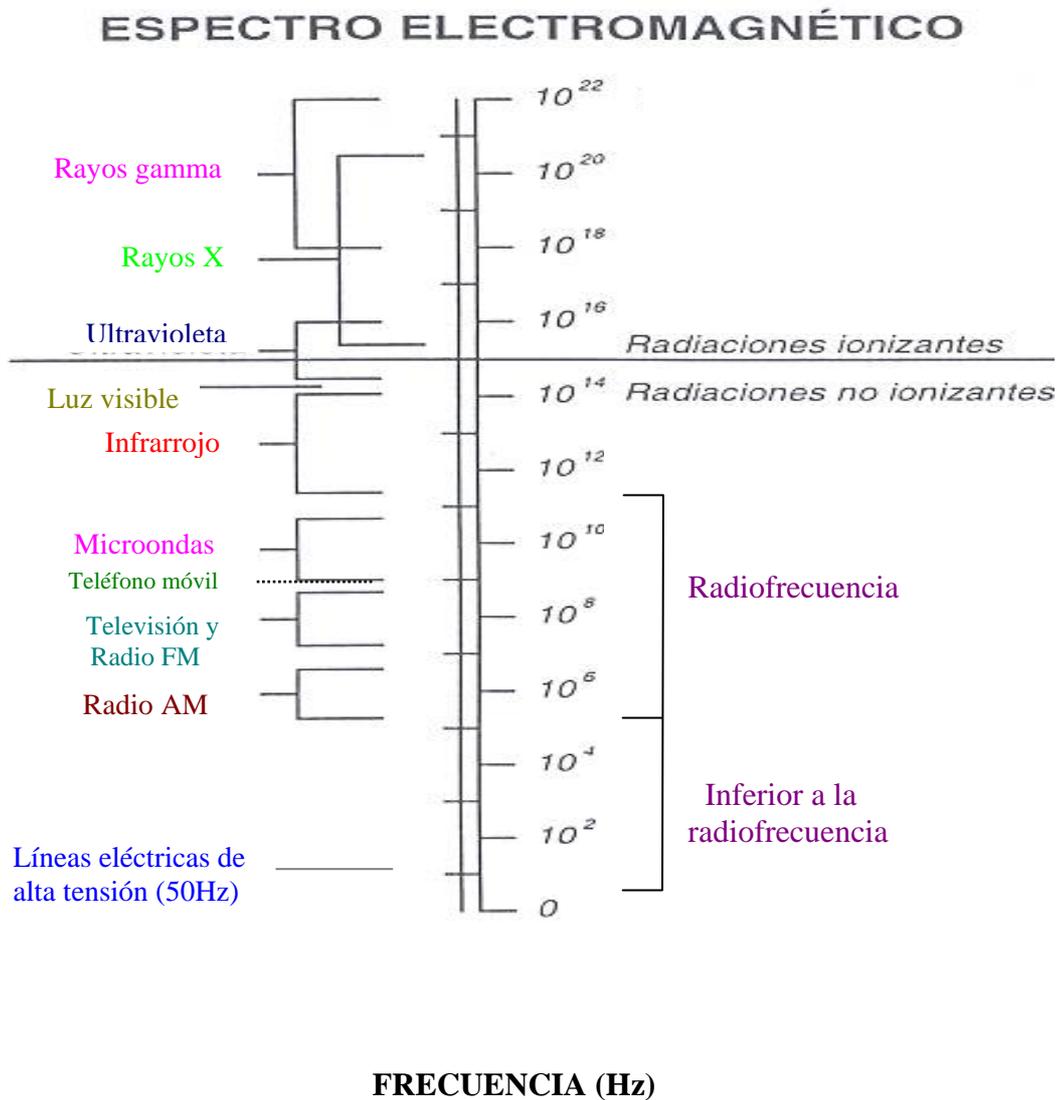


Figura 2. Espectro electromagnético.

El espectro electromagnético se divide en 3 grandes zonas: radiación ionizante, radiación óptica y campos electromagnéticos. Cada zona a su vez se divide en otras. Cada grupo de radiaciones produce diferentes efectos biológicos (Figura 3).

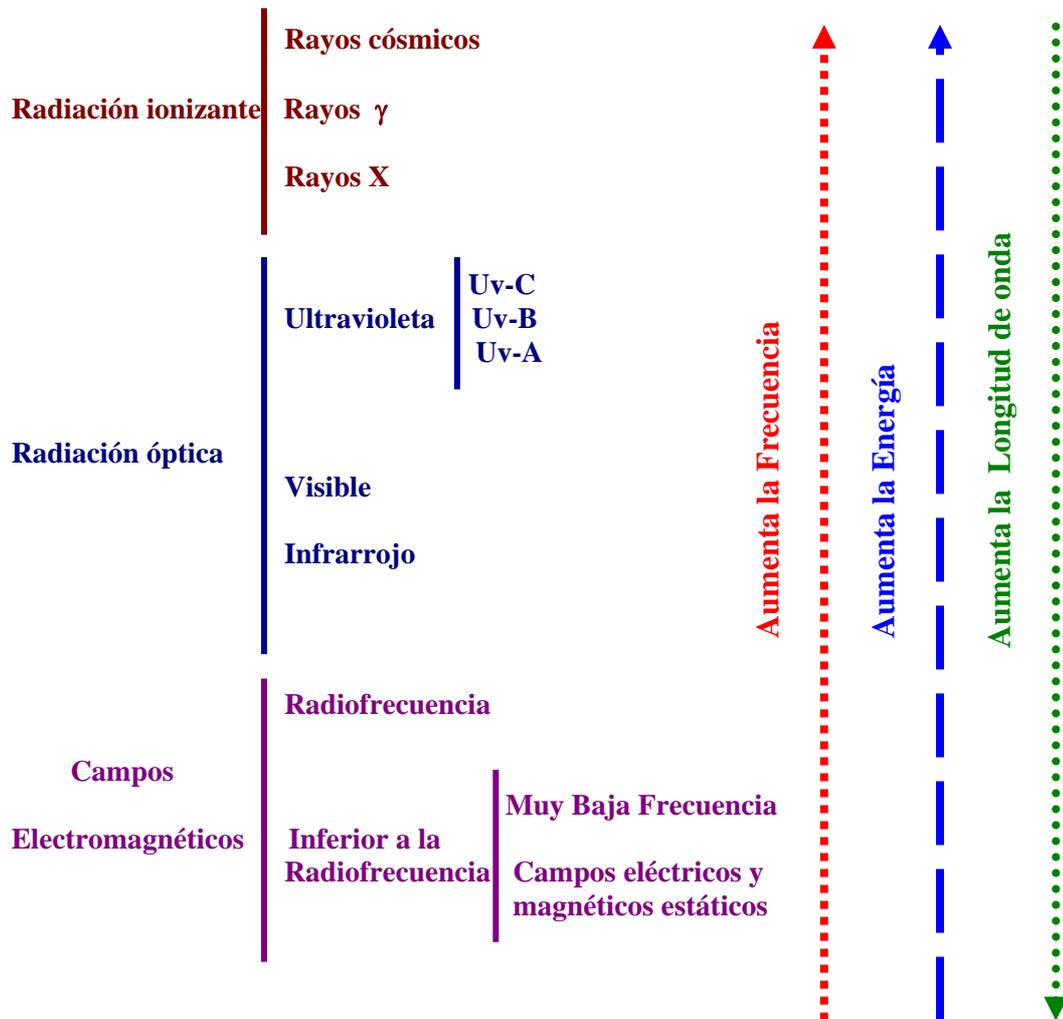


Figura 3. Diferentes zonas del espectro electromagnético.

La división entre las diferentes radiaciones no es tan rígida como se presenta, ya que existen zonas donde los distintos tipos de radiaciones se solapan; por ejemplo los rayos UV más energéticos (UV-C) pueden producir

efectos ionizantes, esto significa que existe un solapamiento entre las zonas de UV y rayos X.

Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes se suelen clasificar por su energía. Producen ionización, lo que provoca reacciones y cambios químicos en el material con que interaccionan.

Dentro de este tipo de radiación se engloban:

La radiación cósmica que proviene del sol o de los espacios interestelares, interacciona con las altas capas de la atmósfera produciendo cascadas de partículas y radiaciones generándose átomos radiactivos. Los rayos γ son de energía superior a los rayos X; aunque los rayos X de mayor energía y los rayos γ de menor energía se solapan en el espectro electromagnético. La radiación γ se genera espontáneamente en los núcleos de los átomos inestables o radiactivos. Por último están los rayos X cuyo poder de penetración en los tejidos humanos es mayor cuanto mayor sea su energía, lo que les permite atravesar espesores considerables y proporcionar imágenes de las estructuras internas del cuerpo humano.

Radiaciones Ópticas

Los principales efectos de estas radiaciones sobre el cuerpo humano son la producción de calor y efectos fotoquímicos. Estos últimos implican que la radiación es capaz de iniciar ciertas reacciones químicas.

Dentro de este tipo de radiaciones están:

Los rayos UV que se dividen en tres zonas, A,B,C. Siendo los UV-C las radiaciones UV de energías más altas, que tienen capacidad ionizante, aunque de muy baja energía. La radiación visible que va desde el azul (la radiación de menor longitud de onda) al rojo (la de mayor longitud de onda). Por último están los rayos infrarrojos cuyo principal efecto es el calentamiento.

Campos electromagnéticos

Son los correspondientes a radiaciones de frecuencia comprendida entre 0-300 GHz. La radiación de los campos electromagnéticos no es ionizante, no induce ni radicales libres, ni expulsa electrones de los orbitales de los átomos sobre los que incide, por tanto no puede romper enlaces químicos. Su energía solamente puede inducir calor, que si persiste sí puede llegar a desnaturalizar proteínas termolábiles, aumentar la temperatura de la zona incidente, y ocasionar dolor en los seres vivos. La energía

electromagnética puede producir vibraciones, torsiones, extensiones y tensiones moleculares, pero en principio, ni roturas ni ionizaciones moleculares.

Se subdivide en dos zonas:

➤ Radiofrecuencia que es la zona del espectro que comprende las radiaciones con frecuencias comprendidas entre los 100 KHz y los 300 GHz. Dentro de esta zona se sitúan las microondas y las ondas por las que transmiten las diferentes emisoras de radio.

➤ Campos electromagnéticos de frecuencia inferior a la radiofrecuencia. Comprenden la zona del espectro entre 0 y 100 KHz. Dentro de esta zona destacan los campos magnéticos de muy baja frecuencia denominados campos magnéticos de frecuencia industrial, que operan a 50 Hz en Europa y 60 Hz en EEUU. A frecuencias muy bajas (50 Hz), los campos magnéticos y eléctricos actúan por separado y cuando nos referimos a esta frecuencia, nos interesa concretamente el efecto que puede producir el campo magnético.

Esta memoria se va a centrar en el estudio de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (50/60) Hz y de radiofrecuencia.

II.1.2. Unidades de medida de los campos electromagnéticos

Para caracterizar la exposición a los campos electromagnéticos, se deben medir las intensidades de los campos eléctricos y magnéticos.

La intensidad de campo eléctrico es una magnitud vectorial (E) que corresponde a la fuerza ejercida sobre una partícula cargada independientemente de su movimiento en el espacio. Se expresa en voltios por metro (V/m).

La intensidad de campo magnético es una magnitud vectorial (H) que, junto con la densidad de flujo magnético, determina un campo magnético en cualquier punto del espacio. Se expresa en amperios por metro (A/m).

El campo magnético se suele medir en términos de densidad de flujo magnético o inducción magnética. Se representa como una magnitud vectorial (B) que da lugar a una fuerza que actúa sobre las cargas en movimiento. Se expresa en Teslas (T), militeslas (mT) y microteslas (μT). La relación entre estas unidades es la siguiente:

$$\boxed{1 \text{ mT} = 10^{-3} \text{ T}} \text{ y } \boxed{1 \mu\text{T} = 10^{-6} \text{ T}}$$

También se utiliza otra unidad, los Gauss (G), y miliGauss (mG);

$1\text{mG} = 10^{-3}\text{ G}$. Los gauss no pertenecen al Sistema Internacional.

Las equivalencias entre teslas y gauss son:

$$1\text{T} = 10^4\text{ G} \quad 1\text{mT} = 10\text{ G} \quad 1\mu\text{T} = 10\text{mG}$$

Existe otra unidad de medida de los campos magnéticos, es el Oersted (Oe). El Oersted tiene el mismo valor que el Gauss. De forma que:

$$1\text{ Oe} = 1\text{ G}$$

II.1.3. Normativa relativa a los campos electromagnéticos

La presencia ubicua de radiaciones electromagnéticas no ionizantes en ambientes urbanos y ocupacionales, es debido al incremento en la utilización de la energía eléctrica y de la tecnología de transmisión de información mediante radiofrecuencias. Las posibles consecuencias de la exposición humana a dichos ambientes son objeto de un creciente interés por parte de la población y de las autoridades responsables de salud pública.

En 1994, el Parlamento Europeo emitió la Resolución A3-0238/94 sobre la lucha contra los efectos nocivos provocados por las radiaciones no ionizantes. En ella se hacía eco del aumento de todo tipo de radiaciones

electromagnéticas artificiales en el medio ambiente, y a pesar de que no estaba demostrada su peligrosidad sobre la salud, recomendaba seguir investigando.

Existe por una necesidad de establecer unos criterios adecuados de seguridad ante exposiciones a radiaciones no ionizantes en ambientes ocupacionales y residenciales. Las autoridades sanitarias nacionales e internacionales han optado por formar “comité de expertos” encargados de estudiar el problema y dictar una legislación adecuada. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) encargó a la Comisión Internacional para la Protección de Radiaciones no Ionizantes (CIPRNI) la elaboración de un conjunto de normas consensuadas para la protección de los ciudadanos ante las radiaciones no ionizantes. Esta comisión publicó sus conclusiones en 1998. Un año después, el Consejo de la Unión Europea (CUE) hizo suyos los criterios y conclusiones de la CIPRNI y promulgó un conjunto de Recomendaciones para la protección del público en general ante posibles efectos tóxicos de la exposición a campos electromagnéticos no ionizantes de 0 a 300 GHz (1999/519/CE, DOCE 1999).

Los niveles de referencia y las restricciones básicas a las exposiciones a campos electromagnéticos recomendados por la CIPRNI (1998) y la CUE (1999) proporcionan con un elevado margen de seguridad, protección contra efectos inmediatos potencialmente nocivos derivados de la excitación

celular/tisular causada por corrientes inducidas, o del trastorno del metabolismo fisiológico por causas térmicas.

Debido a esto, las Recomendaciones CIPRNI-CUE son las más ampliamente aceptadas, y los criterios de seguridad basados en ellas son admitidos por la mayoría de los países y organismos internacionales. Sin embargo actualmente, la base experimental y epidemiológica sobre los posibles efectos nocivos de los CEM es limitada y algunos consideran que se debería prestar más atención a posibles efectos de exposiciones a intensidades próximas o inferiores a los límites recomendados. Esta circunstancia es causa de una falta de consenso entre grupos de expertos y autoridades responsables de sanidad ambiental en distintos países.

Semejante situación genera incertidumbre entre la ciudadanía respecto a la validez de los niveles de seguridad establecidos. Incertidumbre que continuará hasta que no exista un consenso generalizado que permita establecer estándares aceptados por la práctica totalidad de los países. Para ello, es indispensable profundizar en los conocimientos de los CEM a través de investigaciones científicas de calidad. Mientras tanto existe el compromiso de poner los medios para facilitar el cumplimiento de las Recomendaciones CIPRNI-CUE en los países adheridos.

España, al igual que la mayoría de países europeos firmó el conjunto de Recomendaciones, que hoy se encuentran vigentes en todo el territorio nacional. Recientemente se ha firmado el Real Decreto 1066/2001 de 28 de septiembre, 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.

El citado Reglamento tiene por objeto el desarrollo de la Ley 11/1998, de 24 de abril, General de Telecomunicaciones, en lo relativo al establecimiento de condiciones de protección del dominio público radioeléctrico, a la autorización, planificación e inspección de instalaciones radioeléctricas en relación con los límites de exposición a las emisiones, el establecimiento de otras restricciones a las emisiones radioeléctricas, la evaluación de equipos y aparatos y el régimen sancionador aplicable. Asimismo, se desarrolla la Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad, en relación con el establecimiento de límites de exposición para la protección sanitaria y la evaluación de riesgos por emisiones radioeléctricas.

El Real Decreto 1066/2001 asume los criterios de protección sanitaria frente a campos electromagnéticos procedentes de emisiones radioeléctricas establecidos en la Recomendación del Consejo de Ministros de Sanidad de la

Unión Europea, de 12 de julio de 1999, relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos (1999/519/CE, DOCE 1999).

Este Reglamento establece unos límites de exposición referidos a los sistemas de radiocomunicaciones, basados en la citada Recomendación del Consejo de la Unión Europea. Además, el Reglamento prevé mecanismos de seguimiento de los niveles de exposición, mediante la presentación de certificaciones e informes por parte de operadores de telecomunicaciones, la realización de planes de inspección y la elaboración de un informe anual por parte del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

II.1.4. Campos magnéticos de muy baja frecuencia (50Hz).

En los núcleos urbanos de las sociedades industrializadas existe una presencia ubicua y creciente de campos magnéticos de muy baja frecuencia (CM-MBF). Estos campos provienen mayoritariamente del transporte y uso de la energía eléctrica a las llamadas frecuencias industriales (50/60 Hz).

II.1.4.1. Mecanismo de interacción con la materia

El mecanismo de interacción de los CM-MBF con los tejidos vivos es la inducción de cargas y corrientes eléctricas capaces de afectar al

funcionamiento de células y tejidos eléctricamente excitables, como las células del sistema nervioso y muscular. La interacción induce voltajes a través de las membranas de las células implicadas, suficiente para producir el impulso nervioso (nervios) o la contracción muscular (músculos). Este mecanismo explica la capacidad de los humanos y animales para percibir corrientes eléctricas en sus cuerpos y experimentar shock eléctricos (Ribas y col. 2000b).

Si se producen efectos biológicos, se deben asociar a los consiguientes procesos biofísicos y electroquímicos en la membrana celular. Las corrientes inducidas circulan en su mayoría en el medio extracelular y pueden actuar modificando el transporte de iones a través de la membrana, el voltaje, canales de membrana, proteínas de membrana y sitios de unión de hormonas o mitógenos en la superficie celular.

Los CM-MBF no tienen suficiente energía para romper los enlaces moleculares e intramoleculares. Las moléculas están sometidas normalmente a las distorsiones resultantes de las colisiones producidas por iones y otras moléculas a energías térmicas normales (0,3 Kcal/mol aproximadamente 0,04 eV). La ruptura de enlaces covalentes en moléculas biológicas requiere al menos 80 Kcal/mol (aproximadamente 3,6 eV), y el enlace de hidrógeno más

débil requiere alrededor de 2,4 Kcal/mol (0,01 eV) (Polk and Postow 1996). Por comparación, la magnitud de un campo eléctrico producido en un tejido por un campo externo de 50/60Hz y 1 KV, es de $4 \cdot 10^{-5}$ V/m. Aunque la energía de aceleración máxima que dicho campo puede producir es $4 \cdot 10^{-9}$ eV, éste valor es 10^8 veces menor que el que se requiere para romper el enlace macromolecular más débil.

Algunos investigadores han propuesto otra serie de posibles mecanismos para explicar la interacción de campos magnéticos con los tejidos vivos, por ejemplo que los CM pueden afectar al ritmo de las reacciones químicas donde intervengan pares de radicales libres (Grissom 1995), o bien a través de mecanismos de resonancia o de amplificación de señales que hicieran a las células (u organismos) especialmente sensibles a los campos. Sin embargo ninguno de ellos ha sido demostrado físicamente y constituyen únicamente posibles teorías especulativas o que están todavía en estudio.

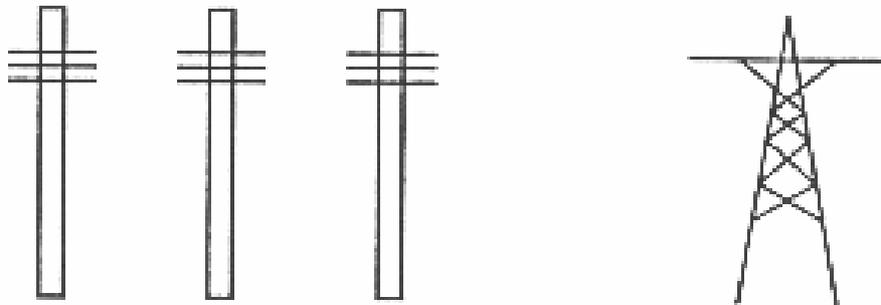
II.1.4.2. Fuentes

Las fuentes de radiaciones de muy baja frecuencia se representan en la tabla 1:

CAMPOS DE MUY BAJA FRECUENCIA	
Campos magnéticos (A/m)	Campos eléctricos (V/m)
<ul style="list-style-type: none"> • Horno de fundición: 80-8.000 • Electrodomésticos: 8-800 • Debajo de una línea de 400 kV: 32 • A 25 metros de una línea eléctrica de alta tensión: 6 • En los hogares: 0,08-0,8 	<ul style="list-style-type: none"> • Sub-estación eléctrica: 20.000 • Electrodomésticos: 10-250 • Debajo de una línea eléctrica de 400 kV: 10.000 • A 25 metros de una línea eléctrica de potencia: 1.000 • En los hogares: 1-10

Tabla 1. Fuentes de campos magnéticos y eléctricos de muy baja frecuencia (50Hz).

Las principales fuentes de campos magnéticos de muy baja frecuencia son los equipos relacionados con la generación, transporte o utilización de la energía eléctrica de 50 Hz, líneas de alta y media tensión (Figura 1) y aparatos electrodomésticos (neveras, lavadoras).



Líneas de distribución (50Hz)

**Líneas de transmisión
de alto voltaje (50Hz)**

Figura 1. Líneas de media y alta tensión. La energía eléctrica de las estaciones generadoras es distribuida hacia los centros de población a través de líneas de transmisión de alto voltaje. Mediante el empleo de transformadores, se reduce el voltaje en las conexiones con las líneas de distribución domésticas.

Los niveles de exposición residencial a los CM de 50 Hz dependen de diversos factores, tales como la distancia a las líneas eléctricas locales, el número y tipo de electrodomésticos empleados en la vivienda, la configuración del cableado eléctrico de la casa, o el tipo de vivienda.

En general, los CM-MBF presentes en el ambiente actúan sobre las cargas eléctricas en movimiento de los organismos expuestos e inducen, campos eléctricos y corrientes dentro de los mismos. Los campos magnéticos

inducen unos circuitos de corriente en el cuerpo, cuya densidad de corriente depende del radio del circuito y de la conductividad de los tejidos (Figura 2, Figura 3).

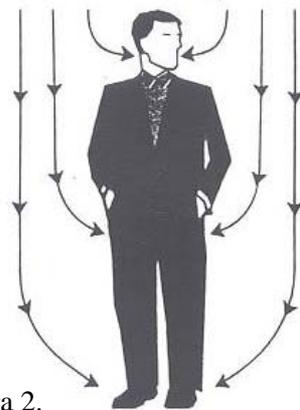


Figura 2.

Los campos eléctricos procedentes de las líneas de corriente eléctrica producen pequeñas corrientes que fluyen hacia el suelo. Las corrientes inducidas son proporcionales a la fuerza del campo.

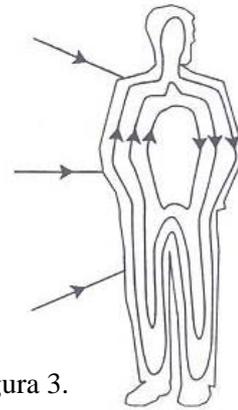


Figura 3.

Los campos magnéticos inducen corrientes que circulan en el interior del cuerpo humano.

II.1.4.3. Límites de exposición

La normativa internacional más exigente y comúnmente aceptada es la promulgada por la Comisión Internacional para la Protección contra la Radiaciones No Ionizantes (CIPRNI) en 1998. Después de examinar toda la literatura científica, la CIPRNI llegó a la conclusión de que los únicos efectos nocivos conocidos y comprobados de los campos magnéticos de frecuencia

industrial (50 Hz o 60 Hz en USA) son los efectos a corto plazo que se producen cuando la densidad de corriente que estos campos inducen en el interior del organismo supera cierto valor umbral (Tabla 2). Las corrientes inducidas en los tejidos (densidades de corriente) se miden en amperio por metro cuadrado (A/m^2).

Densidad de Corriente Inducida	Efectos Biológicos
$< 1 \text{ mA/m}^2$	No hay efectos biológicos
$1-10 \text{ mA/m}^2$	Efectos biológicos mínimos no significativos
$10-100 \text{ mA/m}^2$	Posibles efectos sobre el sistema visual y el sistema nervioso (pequeñas contracciones musculares) sin riesgos para la salud.
$100-1.000 \text{ mA/m}^2$	Estimulación de tejidos excitables, por ejemplo nervios o músculos (contracciones musculares y arritmias), con posibles riesgos para la salud.
$> 1.000 \text{ mA/m}^2$	Posibles extrasístoles y fibrilación ventricular, con riesgos comprobados para la salud.

Tabla 2. Efectos a corto plazo de los campos magnéticos de 50 Hz según la densidad de corriente inducida que generan en el interior del organismo.

La densidad de corriente endógena en el organismo humano, producida por la actividad eléctrica natural en su interior, está alrededor de 10 mA/m^2 ,

aunque puede ser muy superior en zonas determinadas; por ejemplo, una contracción ventricular del corazón puede alcanzar $1.400 \mu\text{T}$.

Así pues, la restricción básica establecida por la CIPRNI para los CM de 50 Hz consiste en mantener en todo momento la densidad de corriente inducida por debajo de 10 mA/m^2 . Además introduce un factor de seguridad adicional de 5 para el público en general respecto a los trabajadores, ya que puede haber individuos especialmente sensibles como niños, ancianos y enfermos que estén expuestos a valores de campo elevados durante mucho tiempo (exposición residencial); por lo que la densidad de corriente inducida para el público no debe superar 2 mA/m^2 .

El inconveniente de este parámetro es que no se puede medir directamente, por lo que hay que realizar unos cálculos para relacionarlo con otros que sí lo sean, como la intensidad de campo. Para ello se aplica un modelo matemático que tenga en cuenta tanto las propiedades eléctricas del organismo expuesto como las condiciones de la exposición (tamaño, forma y posición del organismo), y se promedia en una región específica del cuerpo.

Con estas condiciones, la guía de la CIPRNI establece los valores de referencia para la exposición a CM de 50 Hz (Tabla 3).

Guía CIPRNI	Público	Trabajadores
Campo eléctrico	5 KV/m	10 KV/m
Campo magnético	100 μ T	500 μ T

Tabla 3. Valores de referencia para la exposición a CM de 50 Hz

El Consejo de la Unión Europea, de acuerdo con su Comité Científico Director, publicó en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas una Recomendación para limitar la exposición del público en general a campos electromagnéticos (de 0 Hz a 300 GHz). Esta recomendación se basa en gran medida en la guía de la CIPRNI y uno de sus objetivos es homogeneizar la dispersa normativa sobre campos electromagnéticos de cada uno de los países de la Unión Europea (1999/519/CE, DOCE 1999). Básicamente, recomienda que el público no esté expuesto a CM de 50 Hz superiores a 5kV/m y 100 μ T, en zonas en las que pase mucho tiempo.

El estudio de los efectos biológicos de los campos magnéticos de muy baja frecuencia debe ser multidisciplinar; por ello se necesitan opiniones y conocimientos de diversos grupos de investigación, con el objetivo de establecer con criterio claro y responsable, unos límites dosimétricos seguros. En este tema es imprescindible la colaboración entre especialistas en

medicina, bioquímica y física, por la diversidad de facetas y la falta de claridad inicial en este tema.

La Organización Mundial de la Salud ha organizado diversas reuniones para impulsar la investigación y la colaboración entre países y grupos de investigación. Además en el año 1997 se creó una base de datos para facilitar la información más actual sobre los efectos biológicos de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (Repacholi y Cardis 1997).

II.1.4.4. Estudios epidemiológicos

Exposición residencial a campos magnéticos de 50 Hz

Los datos epidemiológicos sobre efectos cancerígenos y mutagénicos con campos magnéticos de 50 o 60 Hz han proporcionado resultados contradictorios. Los estudios epidemiológicos comenzaron con Wertheimer y Leeper (1979) describiendo un aumento de leucemias en familias que vivían junto a conducciones eléctricas, aunque posteriormente Fulton y col. (1980) no encontraron incremento alguno. Nordström y col. (1983) detectaron un aumento de malformaciones congénitas en hijos de trabajadores de subestaciones de alto voltaje y Tomenius (1986) encontró dos veces más tumores del SNC en personas expuestas a campos de 50 Hz.

En los cinco últimos años se han publicado nuevos trabajos mostrando una relación entre la leucemia infantil y del adulto, así como otros cánceres infantiles con la exposición a CM de 50 ó 60 Hz, aunque se observa cierta falta de rigor entre los estudios realizados (Feychting y Ahlbom 1993, Olsen y col. 1993, Verkasalo y col. 1993, Ahlbom 1997). Linet y col. 1997 realizaron una revisión muy amplia sin conseguir demostrar una relación entre la leucemia infantil y la exposición residencial a un CM de 60 Hz.

En el año 2000 se publicaron dos análisis independientes (Ahlbom y col. 2000, Greenland y col. 2000) en los cuales se evaluaron conjuntamente los estudios publicados sobre leucemia en niños y CM de muy baja frecuencia. En el análisis de Ahlbom se investigaron los datos de 9 estudios, mientras que en el de Greenland se analizaron los datos de 15 estudios. Ambos análisis encontraron un aumento del riesgo del orden de 70-100% con el nivel más alto de exposición, que corresponde en el estudio de Ahlbom a niños expuestos a más de 0,4 μT y en el estudio de Greenland a 0,3 μT . En exposiciones más bajas no encontraron ningún efecto. Por tanto en ambos análisis se concluye que son necesarios estudios en poblaciones altamente expuestas para determinar la asociación entre campos magnéticos de muy baja frecuencia y leucemia infantil.

Exposición ocupacional a campos magnéticos de 50 Hz

Existen un gran número de estudios epidemiológicos que intentan evaluar la posible asociación entre los CM-MBF y el riesgo de ciertos tipos de cáncer como leucemia, tumores en el sistema nervioso central y cáncer de mama en trabajadores expuestos crónicamente a campos relativamente intensos. En algunos estudios se observó un aumento del riesgo de cáncer. Así Floderus y col. (1993), Thériault y col. (1994) y Villeneuve y col. (2000) encontraron una asociación entre los CM de 50 Hz y la leucemia; sin embargo Sahl (1993) y Savit y col. (1995) no observaron ninguna relación.

Por otro lado Savitz y col. (1995), Floderus y col. (1993) y Thériault y col. (1994) detectaron una asociación entre la exposición ocupacional a CM-MBF y cáncer cerebral. Sin embargo Sahl (1993) no encontró ninguna relación.

Aparte de la leucemia y cáncer cerebral, la exposición a CM 50 Hz se ha asociado también con la incidencia de cáncer de mama en mujeres y hombres. En algunos trabajos recientes se ha encontrado un aumento del riesgo de este tipo de cáncer (Pollan 2001).

La metodología empleada en muchos de estos estudios es objeto de crítica debido a una ausencia de dosimetría de campos para dichos

trabajadores y a la existencia de posibles factores de confusión (presencia de tóxicos volátiles en el medio laboral, por ejemplo) que no fueron tenidos en cuenta en algunas investigaciones, por ello, la CIPRNI entiende que la evidencia existente sobre incidencia de cáncer en trabajadores expuestos es limitada e insuficiente.

Un grupo de estudios epidemiológicos recientes ha revelado una tendencia al incremento de riesgo de algunas enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer y esclerosis múltiple) en trabajadores de empresas e industrias relacionadas con la generación y distribución de energía eléctrica. (Davanipour y col. 1997, Johansen y col. 1999). Sin embargo en pocos casos se evaluaron conjuntamente otros factores de riesgo conocidos que podrían afectar a los resultados, por tanto estos estudios requieren un mayor seguimiento y control.

II.1.4.5. Estudios experimentales

Efectos genotóxicos

Los datos experimentales sobre inducción de daño genético son contradictorios, por un lado estudios “in vivo” en trabajadores del ferrocarril expuestos a CM de 50 Hz, realizados por Nordström y col. 1981, describieron

un aumento de aberraciones cromosómicas, que no fueron confirmados por Bauchinger y col. 1981. En estudios “in vitro” con células humanas Nordenson y col. 1984 y Khalil y col. 1991 encontraron alteraciones cromosómicas con CM de 50-60 Hz. Nordenson y col. 1994 usando células amnióticas humanas expuestas a CM de 50 Hz detectaron un incremento de aberraciones cromosómicas, no obstante cuando la intensidad aumentaba a 0,3 mT no observaron efectos. En 1995 Tofani y col. observaron un aumento de micronúcleos en linfocitos expuestos a CM de 50 Hz.

Sin embargo otros estudios no han encontrado efecto genotóxico en linfocitos sometidos a CM-MBF mediante diferentes ensayos citogenéticos como, test de aberraciones cromosómicas (Cohen y col. 1986a), test de intercambio de cromátidas hermanas (Cohen y col. 1986b), ambos test (Rosenthal y col. 1989, García-Sagredo y col. 1990) y ensayo de inducción de micronúcleos (Scarfi y col. 1999).

Según las revisiones realizadas sobre los efectos genotóxicos de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (Murphy y col. 1993, McCan y col. 1993, 1998, 2000) existe una evidencia de que los CM-MBF no tienen potencial genotóxico. Sin embargo también aparecen estudios con resultados positivos, que deberían ser confirmados por una replicación independiente. De estas revisiones y de la literatura científica disponible se deduce la dificultad

de establecer conclusiones serias y fiables de la comparación entre los diferentes trabajos, por los diferentes ensayos, metodologías, células y organismos de experimentación utilizados.

Efectos cancerígenos

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre distintos sistemas biológicos con objeto de valorar experimentalmente la supuesta carcinogenicidad de las exposiciones a campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz).

No existe evidencia de que los campos de 50/60 Hz puedan provocar efectos cancerígenos a través de alteraciones en la estructura del DNA. Por tanto, es improbable que dichos campos actúen como iniciadores del proceso de transformación neoplásica (Tenforde 1996). Si los CM-MBF fueran cancerígenos, actuarían más bien como promotores, acelerando el crecimiento de células que hubieran sufrido daño genético anterior. Estos efectos podrían darse a través de alteraciones en las vías de señalización celular o en la expresión génica. Por esa razón se han realizado estudios dirigidos a detectar posibles efectos de campos de 50/60 Hz en la evolución de tumores previamente iniciados en roedores mediante cancerígenos químicos o radiaciones ionizantes. De estos estudios, los que han detectado un efecto

cancerígeno lo han hecho en tumores de mama o de piel, ambos utilizando animales expuestos a campos intensos de hasta 2 mT (Liburdy y Löcher 1997). Sólo dos trabajos procedentes de un mismo laboratorio (Mevissen y col. 1993, Löscher y col. 1994), han mostrado una tendencia al incremento en la tasa de desarrollo tumoral en ratas expuestas a campos débiles, en el rango de las microteslas. En ambos estudios se observó que dicho efecto iba acompañado de una reducción de la secreción nocturna de melatonina. Un intento de réplica independiente de estos estudios, realizado recientemente, no tuvo éxito. Por tanto, no es posible establecer conclusiones sobre los posibles efectos de los campos de 50/60 Hz sobre la inducción tumoral en cáncer de mama hasta que los estudios citados no sean corroborados y ampliados mediante investigaciones independientes.

Una revisión de los datos experimentales sobre cáncer de mama en roedores muestra que, con la excepción de los citados estudios, no existe evidencia indicativa de que CM-MBF tengan un efecto promotor del cáncer mamario (Boorman y col 2000). McCann y col. 2000, realizaron una revisión de estudios experimentales sobre linfoma, cáncer de mama, cáncer hepático, cáncer cerebral en ratas, cáncer de piel y linfoma en ratones y varios modelos de leucemia humana; de los resultados obtenidos se deduce que los CM de 50 Hz, en el rango de 0,002-5 mT no provocan carcinogénesis en ratas o ratones, siendo la mayoría de los ensayos sobre promoción y progresión

tumoral negativos, sin embargo algunos estudios muestran un efecto promotor de CM bajo ciertas condiciones de exposición, que deberían ser investigados.

La CIPRNI en base a la revisión de la literatura, concluye que no existe por el momento evidencia “convinciente” de efectos cancerígenos por la exposición a CM-MBF y que son necesarios más estudios sobre modelos animales para clarificar los posibles efectos de CM-MBF sobre las señales celulares y la regulación neuroendocrina, factores que pueden influir en el desarrollo de tumores a través de la promoción de la división de células previamente iniciadas.

Alteraciones celulares

Existen varios estudios en los que se ha detectado un aumento de la proliferación celular utilizando diferentes tipos celulares sometidos a CM de 50 Hz, como por ejemplo, líneas celulares epidérmicas de ratón (West y col. 1994), fibroblastos humanos (Kwee y col. 1995) y linfocitos humanos (Scarfi y col. 1999).

Otros trabajos sugieren que los CM-MBF pueden estimular la diferenciación celular en varios sistemas celulares, como osteoblastos (Landry y col. 1997), keratinocitos (Hinsenkamp y col. 1997) y fibroblastos

(Loschinger y col. 1998). En otros estudios no se ha encontrado efectos de los CM 50 Hz en la proliferación celular utilizando diferentes modelos celulares humanos, fibroblastos (Nakajima y col. 1997), células progenitoras hematopoyéticas (Nafziger y col. 1997) y linfocitos (Paile y col. 1995).

Hipótesis de la melatonina

La melatonina (MEL), mediador químico de la glándula pineal (GP), es sintetizada y secretada por dicha glándula siguiendo un ciclo circadiano luz-oscuridad ambiental. Los resultados de diversos estudios indican que la melatonina y sus análogos pueden actuar como oncostáticos, alterando el crecimiento de células cancerosas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Según la llamada “hipótesis de la melatonina” (Stevens 1992), una reducción en los niveles de MEL en sangre causada por exposiciones a CM, provocaría una disregulación de la síntesis de esteroides y un incremento de la incidencia de cánceres hormona-dependientes (mama, próstata). Existe evidencia de que los CM-MBF pueden bloquear la síntesis de melatonina en algunos mamíferos, generalmente roedores.

Se ha descrito una disminución de la concentración de MEL en suero de ratas (Selmaoui y Touitou 1995), hámsters (Yellon 1994) y ratones (Löscher y col. 1994) expuestos a CM-MBF. Sin embargo, John y col. (1998)

no han encontrado alteraciones en los niveles de 6-sulfatoxymelatonina (principal metabolito de la MEL) en ratas expuestas a CM-MBF. Levine y col. en 1995 tampoco observaron efectos sobre el metabolismo de la GP en ratones expuestos a CM-MBF, ni se han encontrado efectos claros de CM-MBF sobre la síntesis de MEL en otros animales, tales como ovejas y primates no humanos (Rogers y col. 1997). De Bruyn y col. 2001 no detectaron cambios en la secreción nocturna de MEL en ratones expuestos a CM de 50 Hz. En este campo de investigación los resultados hasta el momento son contradictorios.

Se han realizado estudios sobre la síntesis de melatonina en relación con los CM-MBF en voluntarios humanos. Se ha sometido a los sujetos a exposiciones cortas (una noche) a CM-MBF de 50 o 60 Hz, y a varias intensidades, del orden de microteslas; los resultados no mostraron cambios significativos en la concentración de MEL en suero (Graham 1996, 1997). Sin embargo, algunos estudios recientes sí han proporcionado indicios de efectos relativos a los niveles de MEL sobre el sueño en sujetos expuestos en su medio laboral (Burch y col. 1999), y en voluntarios sometidos a campos intensos (Akerstedt y col. 1999, Graham y Cook 1999). Pero en estos casos se detectaron los efectos en una baja proporción de sujetos y desaparecían inmediatamente una vez eliminada la exposición. En consecuencia, como los datos que poseemos son contradictorios y poco consistentes, no se puede

confirmar que la exposición a CM-MBF altere significativa e irreversiblemente los niveles de melatonina en humanos. Según Repacholi (1998) se debe ampliar la investigación sobre los posibles efectos de los campos magnéticos de muy baja frecuencia y la síntesis de melatonina y resolver así las dudas que se generan por la aparición de datos contradictorios.

Efectos en los trasductores de señal

Existen numerosos estudios sobre la actividad de enzimas como, la ornitina decarboxilasa (ODC) implicada en la proliferación celular y promoción tumoral (Byus y col 1987, 1988, Litovitz y col. 1991) y la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ implicada en el transporte iónico (Blank 1995).

Se ha observado un aumento de la actividad de la ODC en respuesta a la exposición a CM-MBF en preparaciones celulares (Byus 1987, Litovitz y col. 1991). Sin embargo los cambios *in vitro* de la ODC también se han detectado en exposiciones a CM de 50 Hz *in vivo* (Mevissen y col. 1995).

La proteína kinasa C (PKC) es un receptor de membrana que influye mucho en la actividad de la ODC y otros modelos de promoción tumoral (Kikkawa y col 1989). Se ha descrito un aumento de actividad de la PKC en células tratadas con CM de 50 Hz y 8 μT (Barbiroli y col. 1993), en células

óseas de ratón expuestas a CM de 60 Hz y 0,1 mT (Luben y col. 1994) y en células de leucemia humanas (Uckun y col. 1995).

Los intentos de replicación (Lacy-Hulbert y col. 1995, Saffer y col. 1995) de estos estudios encontraron varias deficiencias, de modo que no se ha podido establecer la reproducibilidad de estos experimentos ni tampoco su relevancia para la salud.

Efectos en el sistema nervioso

Lyskov y col. (1993a,b) realizaron varios análisis espectrales de electrocardiogramas pertenecientes a voluntarios expuestos a 45 Hz, 1,26 mT durante cortos períodos de tiempo y detectaron un incremento de la frecuencia media en las bandas alfa y beta del espectro. Bell y col. (1991, 1992) también relataron alteraciones en el electrocardiograma perteneciente a voluntarios expuestos a campos de 60 Hz y 78 μ T. Se han observado también cambios en la respuesta a tests de razonamiento complejo en voluntarios expuestos a campos magnéticos de muy baja frecuencia, mediante electrodos colocados en la cabeza y en los hombros; las densidades de corriente en el cerebro se estimaron entre 10 y 40 mA/m² (Stollery 1986, 1987). Lyskov y col. (1993), Graham y col. (1994) y Podd y col. (1995) detectaron una disminución en el tiempo de reacción, aunque éste era generalmente pequeño y no siempre se

observaba, otros autores informaron de un descenso en el tiempo de percepción (Cook y col. 1992, Graham y col. 1994).

Efectos en el desarrollo

Existe una evidencia experimental indicativa de que la exposición a CM-MBF en el rango de 1-100 μ T puede ejercer efectos sobre la embriogénesis en peces, anfibios y pájaros (Berman y col. 1990, NRC 1996, Farrell y col. 1997). Existen algunos trabajos que muestran una mayor sensibilidad de los embriones de ratón a los CM-MBF, sin embargo en otros muchos experimentos, el resultado fue negativo (NRC 1996, Juutilainen y Lang 1998, Ryan y col 1996, Sienkiewicz y col. 1994, Svedenstal y Johansson 1995). El National Research Council 1996, concluyó basándose en estudios con ratones expuestos a CM-MBF durante el embarazo o durante largos períodos de tiempo que, parece improbable que los campos magnéticos de muy baja frecuencia tengan efectos adversos en el desarrollo embriogénico o postnatal de mamíferos.

Efectos en el sistema inmune y hormonas

No se han observado cambios en la química de la sangre, conteo de células sanguíneas, gases sanguíneos, temperatura corporal o circulación de hormonas (Sander y col. 1982, Maresh y col. 1988, Graham y col. 1994). Dos trabajos realizados por Selmaoui y col. (1996, 1997) indican que una exposición aguda durante una noche a CM-MBF y 10 μ T no produjo efectos en los parámetros hormonales ni inmunológicos de voluntarios sanos.

Otros efectos: Hipersensibilidad Electromagnética

Algunos individuos afirman ser extremadamente sensibles a los campos electromagnéticos, refiriendo una variedad de síntomas que asocian a la exposición a estos campos. Los síntomas se localizan principalmente en el sistema nervioso, piel, sistema muscular y ojos. En el sistema nervioso se acusa fatiga, estrés, insomnio y otros trastornos nerviosos y psíquicos. Entre los síntomas dermatológicos se relata prurito, sensación de quemazón y algunos individuos relatan erizamiento del pelo en las extremidades. En el sistema muscular se ha detectado dolor y molestias musculares y en los ojos, sensación de quemazón ocular, blefaritis y conjuntivitis. Han aparecido también otros síntomas de menor entidad como problemas de oído, nariz,

garganta y trastornos gastrointestinales. Todos estos síntomas corresponden a la llamada hipersensibilidad electromagnética (Ribas y col. 2001c).

Staudenmayer y col. 1999, en un reciente libro de revisión sobre enfermedades ambientales señala, diversos aspectos y facetas sobre la sensibilidad electromagnética. Los recientes informes de la Comisión Europea, de Berqvist y Vogel, 1997, y de la Organización Mundial de la Salud de Repacholi, 2000, señalan que ciertos individuos sufren una variedad de problemas de salud, que tienen su origen en fuentes de campos electromagnéticos. Estas fuentes incluyen líneas de alta tensión, electrodomésticos, pantallas luminosas, teléfonos móviles y sus respectivas estaciones base. El informe de la Comisión Europea estima que la prevalencia de la hipersensibilidad electromagnética, considerada enfermedad medioambiental, es de varios individuos por millón de habitantes, sin embargo algunas opiniones científicas la consideran más elevada, y un 10% de los casos afectados son calificados de graves.

Se ha establecido una serie de conclusiones sobre la hipersensibilidad electromagnética: está caracterizada por una variedad de síntomas no específicos, no tiene un criterio diagnóstico claro, los síntomas referidos por los individuos que lo padecen son reales y hasta ahora no existe una base

científica que relacione los síntomas de la hipersensibilidad electromagnética con la exposición a los campos electromagnéticos (Repacholi 2000).

II. 1. 5. Campos electromagnéticos de radiofrecuencia

Los campos de radiofrecuencia (RF) se definen como campos electromagnéticos con frecuencias comprendidas entre 100 KHz y 300 GHz.

II.1.5.1. Mecanismo de interacción con la materia

La exposición a campos de radiofrecuencia puede causar calentamiento o inducir corrientes eléctricas en los tejidos biológicos y afectar al metabolismo.

➤ A frecuencias bajas el efecto dominante de la exposición es la inducción de corrientes eléctricas en el organismo. La interacción de campos eléctricos variables en el tiempo con los tejidos biológicos que también poseen una diferencia de carga eléctrica en el interior y el exterior de la membrana celular tiene como consecuencia el aumento de flujo de cargas eléctricas, la formación de dipolos y la reorientación de los dipolos eléctricos presentes en la membrana. Las magnitudes relativas de estos efectos dependen

de las propiedades de la estructura sobre la que incide el campo, conductividad, permitividad, etc (CIPRNI 1998).

Los campos de radiofrecuencia inducen momentos en las moléculas que tienen como consecuencia desplazamiento de iones desde posiciones estables, vibraciones entre las capas sobre todo entre electrones e iones y rotación y reorientación de moléculas dipolares como el agua.

Las numerosas reacciones químicas inherentes a los procesos vitales se asocian a corrientes normales de unos 10 mA/m^2 . Las densidades de corriente inducida que excedan de 100 mA/m^2 como mínimo, pueden perturbar el funcionamiento normal del organismo y causar contracciones musculares involuntarias.

➤ A frecuencias elevadas el principal efecto de estos campos es el calentamiento. Los campos de RF de más intensidad penetran en los tejidos expuestos y producen calentamiento debido a la absorción de energía. Los efectos nocivos que provocan son debidos al calentamiento inducido, cuyo resultado consiste en el aumento de la temperatura tisular o corporal superior a 1°C . El calentamiento inducido puede provocar alteraciones en la fisiología y bioquímica de los tejidos afectados en los individuos expuestos, tales como hipertermia leve o severa, alteraciones en el desarrollo embrionario, abortos,

cataratas y quemaduras superficiales o profundas (CIPRNI 1996, IEEE 1992, WHO 1993, CIPRNI 1998).

Si el incremento de la temperatura corporal inducido por la exposición a la radiación es menor de 1°C, la sangre circulante es capaz, en general, de disipar el exceso moderado de calor (Müller y col. 1995). Sin embargo, en determinadas estructuras poco vascularizadas, como por ejemplo el interior del ojo, el citado incremento de temperatura no es controlado por la regulación homeostática y puede dar lugar a daños irreversibles.

II. 1.5.2. Fuentes

Los niveles naturales de radiofrecuencia en el ambiente son bajos, sin embargo hay una gran variedad de fuentes antropogénicas que pueden aumentar considerablemente la exposición humana. La exposición ambiental a radiofrecuencias ha sido dominada por los transmisores de radio y televisión, pero últimamente se está produciendo un incremento de nuevas fuentes de radiofrecuencia debido a telefonía móvil y sus estaciones base. Las fuentes artificiales pueden dividirse según se localicen en la comunidad, el hogar o el lugar de trabajo (Ribas y col. 2000a).

➤En la comunidad: la mayor parte de los campos de radiofrecuencia proceden de receptores de radio (AM/FM) (Figura 1) y televisión y antenas de estaciones base para telefonía móvil (Figura 2).

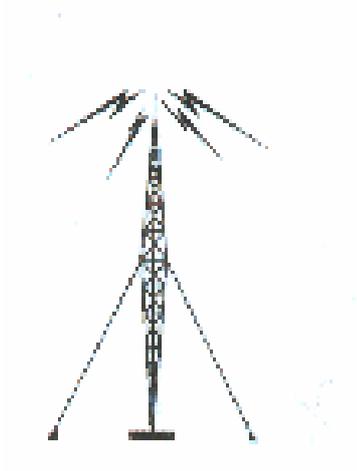


Figura 1. Antena de radio

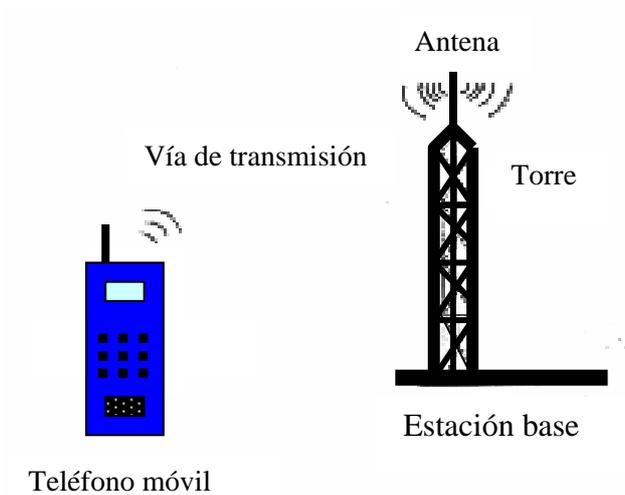


Figura 2. Estación base de telefonía móvil.

Mediante el teléfono móvil se transmiten datos a la estación base que es una unidad estacionaria instalada en una posición óptima dentro del área de cobertura. Incluye antenas emisoras y receptoras y los sistemas necesarios para actuar de enlace entre sus teléfonos móviles y la red pública de teléfonos. En estaciones base propias de áreas rurales o poco pobladas, las antenas están montadas en mástiles o torres. En áreas urbanas, las antenas se ubican en las azoteas o partes altas de los edificios.

Otras fuentes de radiofrecuencia son las antenas de comunicaciones vía satélite (Figura 3) y los radares.

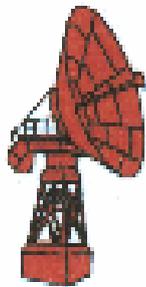


Figura 3. Antena de comunicación vía satélite.

➤En el hogar: entre las fuentes domésticas de radiofrecuencia figuran los hornos de microondas, los teléfonos móviles y los dispositivos de alarma antirrobo. Los hornos de microondas, que en principio podrían originar niveles de radiofrecuencias muy elevados, están sujetos a normas de calidad del producto que limitan las fugas.

➤En el lugar de trabajo: existen varios procesos industriales que utilizan campos de radiofrecuencias, por ejemplo los calentadores dieléctricos empleados para laminación de maderas y sellado de plásticos, los calentadores por corrientes de inducción y los hornos de microondas para uso industrial; el equipo de diatermia quirúrgica para tratar el dolor y la inflamación de tejidos orgánicos y la electrocirugía para cortar y soldar tejidos. Los campos de radiofrecuencias en las proximidades del equipo utilizado en el lugar de trabajo pueden ser superiores a varias decenas de W/m^2 . Todos esos niveles de exposición están reglamentados a nivel nacional e internacional (Ribas y col. 2000b).

Los valores de campo magnético y eléctrico para algunas fuentes de radiofrecuencia vienen expresados en la Tabla 1.

RADIOFRECUENCIA	
Campos magnéticos (A/m)	Campos eléctricos (V/m)
<ul style="list-style-type: none"> • Hornos de inducción: 10-1000 • Operadores de soldadores PVC: 0,1-1 • Transmisores de televisión: 0,1-1 • Antenas de radiofrecuencia de baja potencia: 0,1-1 • Torres de televisión: <0,01 	<ul style="list-style-type: none"> • Calentadores de inducción: 2- 100 • Operadores de soldadores PVC: 20-800 • Transmisores de televisión: 30-300 • Antenas de radiofrecuencia móviles: 200-1500 • Torres de televisión: 1

Tabla 1. Fuentes de radiofrecuencia.

II. 1.5.3. Límites de exposición

Los niveles límite de exposición han sido establecidos por comisiones de expertos basándose en la evidencia experimental disponible. Estos límites son empleados en la elaboración de normativas de seguridad de aplicación a nivel nacional o internacional.

En lo referente a emisiones de radiofrecuencia, los límites de exposición más difundidos son los del Institute of Electrical and Electronics Engineers and American National Standards Institute (IEEE/ANSI) y sobre todo los de la Comisión Internacional de protección contra las radiaciones no ionizantes (CIPRNI).

Los límites pueden venir expresados en dos tipos de unidades; cuando interesa describir la potencia de la radiación en el aire, sin atender a su interacción con un cuerpo expuesto a la señal, se emplea la densidad de potencia (S), que se define como potencia por unidad de superficie perpendicular a la dirección de propagación de la onda electromagnética, y que viene dada en vatios por metro cuadrado (W/m^2) o en mW/cm^2 . Si por el contrario, el interés de la medida radica en valorar la forma en que la energía de una radiación es absorbida por un cuerpo dado, se calcula la tasa de absorción específica (Specific Absorption Rate: SAR). La SAR es la derivada en el tiempo del incremento de energía (dW) absorbida por una masa diferencial (dm) contenida en un volumen diferencial (dV) y que tiene una determinada densidad. Se expresa en W/Kg de masa. El valor de la SAR es, por tanto, dependiente, entre otros parámetros, del valor de la densidad de corriente inducida por la radiación en el tejido (A/m^2), de la densidad del tejido (Kg/m^3) y de la conductividad del tejido (en S/m).

La CIPRNI ha establecidos unos niveles de referencia y restricciones básicas para exposiciones a radiofrecuencia que vienen representadas en las tablas 2 y 3.

Niveles de referencia (NR) y restricciones básicas (RB) para exposiciones a radiofrecuencia. Guía CIPRNI		
Densidad de potencia W/m^2		
Frecuencia (MHz)	Público	Ocupacional
400-2.000	f/ 200 (NR)	f/40 (NR)
2.000-300.000	10 (NR)	50 (NR)
10.000-300.000	10 (RB)	50 (RB)

Tabla 2. Niveles de referencia (NR) y restricciones básicas (RB) para exposiciones a radiofrecuencia.

Las restricciones básicas son restricciones en los niveles de exposición basados en efectos sobre la salud. Para asegurar una protección contra tales efectos, los valores correspondientes no deben ser rebasados.

Los valores de niveles de referencia de exposición (NR) se basan en las restricciones básicas y se han obtenido a partir de modelos matemáticos y de extrapolaciones de resultados experimentales. Los NR se proporcionan para ser comparados con valores medidos en el ambiente. Aquellas condiciones que no sobrepasen los niveles de referencia cumplirán con seguridad las restricciones básicas. Mediciones que den valores superiores de a los NR no implican necesariamente que las RB hayan sido sobrepasadas, pero sí aconsejan análisis más detallados para garantizar el cumplimiento de las

restricciones. Las densidades de potencia han de ser promediadas sobre cualquier área de 20 cm² de superficie expuesta y para períodos de $68/f^{1.05}$ minutos (f es la frecuencia en GHz).

Restricciones básicas (RB) para exposiciones a radiofrecuencia. Guía CIPRNI		
SAR W/Kg (Entre 0,1 y 10.000 MHz)		
Localización	Público	Ocupacional
Cuerpo completo	0,08 (RB)	0,4 (RB)
Cabeza y tronco	2 (RB)	10 (RB)
Miembros	4 (RB)	20 (RB)

Tabla 3. Límites de exposición SAR.

Todos los valores SAR han de ser promediados sobre cualquier período de 6 minutos y se refieren a SAR absorbidos por 10 g de tejido contiguo. En general, los límites admisibles de los campos de radiofrecuencias fijados por la CIPRNI se sitúan muy por encima de los niveles observados en el entorno.

Para la frecuencia propia de las antenas de estaciones base, la normativa CIPRNI establece un límite de exposición para el público de aproximadamente 10 W/m², lo que corresponde a un SAR de 0,08 W/Kg de

masa corporal. Para elaborar estos estándares los expertos evaluaron resultados de diferentes estudios experimentales realizados en animales, y a partir de ellos se determinó el valor de la tasa de absorción específica (SAR) que provoca un incremento de 1°C en la temperatura de un tejido corporal. Este valor fue dividido por 10 para establecer los límites de seguridad ocupacional. Este último valor fue reducido de nuevo, esta vez en un factor de 5 para establecer el nivel de seguridad para exposiciones recibidas por el público en general.

II. 1.5.4. Estudios epidemiológicos

Son clásicos los estudios realizados por Robinette y col. en 1980 en trabajadores de radar donde después de una exposición de hasta 20 años no se incrementa el riesgo de cáncer asociado con la RF, o de los empleados de la embajada de EEUU en Moscú que fueron expuestos a bajos niveles de RF durante años, ninguno de los dos estudios encontró una relación adversa en lo que respecta a los parámetros estándar de salud.

Sin embargo los resultados obtenidos en posteriores investigaciones y la interpretación crítica de estos primeros realizada por Goldsmith (1995) cambió un poco la perspectiva, se encontraron incrementos significativos de cáncer entre el personal militar expuesto a RF con altos porcentajes de

leucemia y linfomas pero los cálculos de exposición a RF no estaban perfectamente definidos (Szmigielski 1996).

Los diferentes grupos que han realizado revisiones de estudios epidemiológicos sobre las posibles relaciones entre cáncer y radiofrecuencia concluyen que no existe una evidencia consistente de riesgo cancerígeno (IEEE 1992, NRPB 1992, WHO/UNEP/IRPA 1993, CIPRNI 1996, EC 1996). En general, estos estudios epidemiológicos sufren de inadecuados cálculos de exposición (CIPRNI 1996, EC 1996).

Publicaciones recientes de Elwood y col. (1999), Moulder y col. (1999) y NRPB (2000) presentan una revisión crítica de los estudios experimentales y epidemiológicos más relevantes de los últimos años, en relación a la leucemia, linfoma, cáncer de cerebro y cáncer de mama. Los autores concluyen que los estudios epidemiológicos sobre RF no sugieren una asociación causal entre cáncer y exposición a las RF, pero estos estudios son escasos y presentan deficiencias en la cuantificación de la exposición. Hacen falta nuevos estudios que midan los posibles efectos de la exposición crónica a RF con una metodología más controlada, hasta ahora los resultados obtenidos no son concluyentes.

También se han llevado a cabo estudios sobre voluntarios que eran expuestos a radiaciones de RF en ambientes controlados. Los resultados han mostrado respuestas relativamente inconsistentes y difíciles de interpretar desde el punto de vista de posibles efectos sobre la salud. Se han observado cambios inespecíficos en el electroencefalograma o mayor velocidad de respuesta en tests, que constituyen indicios de potenciales respuestas biológicas ante una excitación eléctrica, más que efectos nocivos capaces de provocar daños permanentes en la salud.

Respecto al teléfono móvil se ha sugerido que su uso prolongado y frecuente podría provocar dolores de cabeza (Frey 1998). Así un estudio epidemiológico realizado por Mild y col. (1998) entre usuarios de teléfonos móviles, indicaba que éstos mostraban una tendencia a declararse aquejados de dolor de cabeza con más frecuencia que los usuarios de teléfonos convencionales. El estudio no es concluyente debido a limitaciones metodológicas y a potenciales diferencias socioculturales entre las dos muestras comparadas.

Leeuwen y col. (1999) han descrito que en las peores condiciones de uso y con el modelo de teléfono de mayor potencia de emisión podrán darse, en zonas intracraneales inmediatas a la antena del teléfono, microincrementos de temperatura inferiores o iguales a $0,1^{\circ}\text{C}$. Se calcula que estos

microincrementos de temperatura serían disipados inmediatamente por la sangre circulante debido a que el tejido nervioso del cerebro, por su necesidad de equilibrio térmico, está muy vascularizado.

En los años 1999 y 2000 se han presentado dos estudios similares sobre usuarios de teléfonos móviles. Hardell y col (1999) compararon frecuencias de cánceres cerebrales entre usuarios de teléfonos móviles y no usuarios (controles) no encontrando diferencias significativas. El estudio realizado por Muscat (2000), no detectó incremento de cánceres cerebrales, en general, aunque se encontró un riesgo incrementado de tumores en el lado del cerebro en el que se aplicaba el teléfono móvil. Sin embargo, el mismo incremento se detectó en usuarios de teléfonos móviles. No se encontró efecto de dosis en la respuesta (el riesgo no era mayor para aquellos sujetos que usaron más el teléfono móvil). Los datos que se desprenden de ambos estudios no son concluyentes ya que la cuantificación de los niveles de exposición de los sujetos incluidos en estos trabajos fue muy poco precisa. Además, las muestras eran pequeñas y los incrementos relativos de riesgo, no estadísticamente significativos.

En una investigación reciente los autores concluyen que el uso de los teléfonos móviles no está asociado con un riesgo de cáncer de cerebro, sin

embargo son necesarios nuevos estudios durante varios años, para evaluar el riesgo en personas que los utilizan con mucha frecuencia (Inskip y col. 2001).

II.1.5.5. Estudios experimentales

Los estudios sobre efectos biológicos de campos electromagnéticos de radiofrecuencia, han proporcionado resultados contradictorios.

Efectos genotóxicos

La mayoría de las evidencias experimentales desarrolladas en laboratorio indican que los campos de RF no tienen efectos genotóxicos (IEEE 1992, NRPB 1992, Cridland 1993, WHO/UNEP/IRPA 1993, EC 1996).

Se han realizado un gran número de estudios “in vitro” para detectar los efectos de la exposición a RF en el DNA y en la estructura de los cromosomas. La mayoría de estos estudios han encontrado resultados negativos y solo han sido positivos cuando por efecto de la RF se ha incrementado la temperatura del medio de cultivo (WHO/UNEP/IRPA 1993).

En la mayoría de los casos no se observa ningún efecto producido por la exposición a RF ni aberraciones cromosómicas en células humanas. Sin embargo Maes y col. en 1996 expuso linfocitos de sangre periférica humana a RF (2,45 GHz) con una temperatura constante y encontró un marcado incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas y micronúcleos, pero no se vieron afectadas la proliferación celular y el intercambio de cromátidas hermanas. Lai y Singh (1995, 1996) encontraron daño genético en células nerviosas de ratas expuestas a 2,45 GHz y 0,6-12 W/Kg. Malyapa y col. en 1997, intentaron replicar las condiciones de Lai y Singh, sin embargo, no detectaron efectos en el DNA de células nerviosas. Cain y col. 1997 no observaron efectos genotóxicos en fibroblastos sometidos a 2,45 GHz 1-12,5 W/Kg. Recientemente se han realizado dos revisiones utilizando estudios *in vitro* e *in vivo* sobre los efectos de la radiofrecuencia, ambas revisiones concluyen que las RF no provocan daño en el DNA o estructuras cromosómicas, excepto para RF capaces de elevar la temperatura del sistema biológico (Verschaeve y Maes 1998, Brusick y col. 1998). Otros estudios posteriores no detectaron inducción de micronúcleos ni aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos expuestos a 835.62 MHz y una SAR de 5 W/Kg (Vijayalaxmi y col. 2001).

Efectos cancerígenos

En lo que se refiere a posibles efectos cancerígenos en animales (roedores, generalmente) no se han obtenido datos consistentes de incremento en la incidencia de distintos tipos de cánceres. Una excepción la constituyen los resultados publicados por Repacholi y col. en 1997. Este equipo empleó ratones genéticamente proclives al desarrollo de linfomas y luego los sometieron a campos de radiofrecuencia. Al final del estudio se encontró un incremento modesto, pero estadísticamente significativo, en la frecuencia de linfomas. No se detectaron cambios en la frecuencia de otros tipos de cánceres. Este trabajo todavía no ha sido replicado independientemente, por lo que no es posible valorar en términos de salud humana la relevancia de los datos descritos.

Otro indicio de potencial nocividad fue el descrito por Cleary y col. en 1992. Estos autores hallaron un exceso de tumores en ratas inyectadas intracranealmente con un cancerígeno químico y expuestas posteriormente a radiofrecuencia en condiciones de SAR entre 5 y 25 W/Kg. Sin embargo un estudio reciente, Roti y Roti en 1999, empleando una metodología similar a la de Cleary, no ha encontrado efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los tumores provocados.

Liddle y col. (1994), no observaron un incremento de incidencia de cáncer en ratones expuestos a 2,45 GHz 2-6,8 W/Kg. Salford y col.(1993) tampoco detectaron incidencia en la progresión de tumores cerebrales en ratas inyectadas con células de tumor cerebral y sometidas a 915 MHz. Otros autores no encontraron incremento de incidencia de tumores mamarios en ratones proclives a desarrollar cáncer de mama sometidos a RF: 435 MHz, 1 mW/m² (Toler y col. 1997) y 2,45 GHz, 0,3 W/Kg (Frei y col. 1998). Imaida y col. (1998) tampoco hallaron un aumento de incidencia de tumores hepáticos en ratas tratadas con un cancerígeno hepático y sometidas a 929 MHz 0,6-0,9 W/Kg en comparación con controles expuestos sólo al cancerígeno químico.

En general, los datos disponibles actualmente indican que, por debajo de los niveles a que se dan efectos térmicos, las RF no generan respuestas mutagénicas y no influyen en la iniciación de cánceres. Los estudios que sugieren una posible acción cancerígena o de influencia en procesos de promoción o progresión tumoral están poco controlados y son demasiado escasos para constituir un bloque de evidencia firme, aunque sí son suficientes para aconsejar la realización de nuevos estudios, de acuerdo con las recomendaciones de la OMS.

Alteraciones celulares

Varios estudios se han dirigido a determinar si la exposición a RF afecta a las respuestas proliferativas de los linfocitos. Estas células son activadas “in vitro” mediante ligandos mitógenos de los receptores celulares y constituyen un modo habitual de producir una transformación celular.

Muchas de las investigaciones desarrolladas con RF en la transformación de linfocitos han sido negativas, sin embargo Czerska y col. en 1992 observaron un incremento de la activación de linfocitos humanos expuestos a campos de 2,45 GHz. Cleary y col. (1990, 1996) detectaron alteraciones en la transcripción mediante la incorporación de un precursor del RNA ^3H uridina después de la exposición de células de glioma a campos de RF. Obtuvieron efectos similares en la proliferación celular utilizando precursores del DNA ^3H timidina en gliomas y linfocitos humanos. La transcripción y la proliferación celular fueron estudiadas a intensidades SAR fuera del rango comprendido entre 5 y 25 W/Kg, sin encontrarse cambios por encima o debajo de estos valores. No está claro qué efectos suceden con otros valores SAR a los que la mayoría de la población está habitualmente expuesta.

Efectos en la membrana celular

Los campos de radiofrecuencia afectan a una variedad de propiedades de los canales iónicos como son, la disminución de la formación de canales y de la frecuencia de su apertura. Así parece que, bajas intensidades de RF afectan a los canales de membrana (WHO/UNEP/IRPA 1993, Krewski y col. 2001). El efecto de las RF sobre el transporte de cationes como el Na^+ o el K^+ a través de la membrana indica que los cambios pueden suceder sin producirse alteraciones de la temperatura (Cleary 1995). Este efecto se produce en un rango de SAR de 0,2-200 W/Kg y a frecuencias de 27 MHz a 10 GHz.

Otros efectos sobre el flujo iónico, como son alteraciones en la bomba de sodio potasio y la ATPasa en los glóbulos rojos ha sido atribuida a la interacción de los campos de RF con moléculas en la membrana que contienen estos iones, posiblemente esta interacción está mediada por las transiciones de fase de la membrana (Liu 1990).

Los radicales libres también se han propuesto como participantes en las transiciones de fase producidas por las RF en los lípidos de membrana expuestos a campos de RF de 2,45 GHz a 0,2 W/Kg (Phelan 1992).

Estudios in vitro con células cerebrales humanas han encontrado pérdida de Ca^{++} en las terminaciones nerviosas sometidas a RF moduladas

entre 147 y 450 MHz (Addey 1993). Efectos similares se observaron en sinaptosomas (Addey 1981) y en células de neuroblastoma humano expuestas a radiofrecuencia (Dutta y col. 1984). Sin embargo otros grupos de trabajo han fracasado a la hora de repetir estos resultados.

Efectos en los transductores de señal

La actividad de la ornitina decarboxilasa (ODC) es modulada por la membrana mediante señales y su activación está asociada con la aparición de agentes promotores de tumores durante la carcinogénesis. Byus y col. en 1988 observaron un aumento de la actividad de la ODC en células de melanoma humano y en hepatoma de células de rata expuestas a 450 MHz, pero no cuando se exponían a frecuencias más altas o más bajas. Los investigadores interpretan estos resultados como un indicativo de que son determinadas señales las que modulan la activación de la ODC. Penafiel y col. (1997) detectaron un incremento de ODC en fibroblastos de rata sometidos a RF con una SAR de 3 W/Kg. En ambos estudios los niveles de ODC inducidos fueron mucho menores que los asociados con la acción de los agentes promotores tumorales. Sin embargo no se ha comprobado el incremento en la proliferación celular o alteraciones en la síntesis de DNA.

Efectos en el sistema inmune

Se han identificado pocos efectos biológicos significativos en estudios “in vitro”, sin embargo sí se han hallado alteraciones en el comportamiento de los linfocitos (Lyle 1983) y en la actividad de la linfocito-kinasa (Byus 1984) después de la exposición a campos de RF. Debido a que el sistema inmune es complejo y presenta una gran variedad de modelos biológicos y de sistemas de exposición, los resultados son aún bastante inconsistentes.

Efectos en el sistema nervioso

Se han descrito algunos efectos en animales, tales como alteraciones electrofisiológicas y cambios en la transmisión sináptica en tejido nervioso expuesto a radiofrecuencia. La exposición a muy bajos niveles de radiofrecuencia provocó alteraciones en la actividad eléctrica de gatos y conejos (IEEE 1992, UNEP/WHO/IRPA 1993). Chizhencova y Safroshkina (1996) detectaron cambios en los patrones de electroencefalograma de conejos expuestos a RF (800 MHz). Pu en 1997 también desarrolló un diseño experimental en ratones expuestos a RF (3 GHz) encontrando alteraciones en el electroencefalograma, hallazgos parecidos presentaron Vorobyov y col. (1997). Estudios realizados por Lai y col. (1989, 1994), demostraron que la exposición a bajos niveles de RF puede afectar a la neuroquímica del cerebro

de manera que coincide con las repuestas bioquímicas al estrés; observaron que la exposición de ratas a RF, 2,45 GHz y SAR 0,6 W/Kg alteraba la actividad colinérgica del cerebro, afectando al aprendizaje y a la memoria. En un estudio reciente, Tattersall y col. 2001 sugieren que los CEM de RF pueden modular la actividad eléctrica del hipocampo de rata *in vitro*.

Aunque estos resultados en animales aún no han tenido su correlación en estudios con humanos, sería especialmente interesante establecer la relación de la exposición a RF con algunas patologías relacionadas con la actividad eléctrica cerebral como la epilepsia.

La barrera hematoencefálica

Los primeros estudios realizados indican que si la exposición a RF causa suficiente calor se incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a ciertas sustancias habitualmente excluidas del parénquima cerebral (WHO/UNEP/IRPA 1993, EC 1996). En varios trabajos se ha observado un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratas expuestas a RF (915 MHz-2,45 GHz) y una SAR de 0,016 W/Kg (Neubauer y col. 1990, Salford y col. 1994). Sin embargo en otros estudios no se ha establecido cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica utilizando bajos niveles de exposición (Krewski y col. 2001).

Estudios sobre la melatonina

En humanos hasta ahora no se ha encontrado una inhibición de la producción de melatonina debida a la exposición a RF (Graham y col. 1996). Un reciente estudio para evaluar los efectos en los ritmos circadianos del uso de los teléfonos móviles (De Seze 1999) tampoco ha encontrado una alteración en los parámetros normales de melatonina, con la exposición a la RF producida por estos sistemas.

Otros efectos: Hipersensibilidad Electromagnética

Se han relatado varios síntomas no específicos que se relacionan con la Hipersensibilidad Electromagnética (Ribas y col. 2001c), ya descrita anteriormente en un apartado de esta memoria (II.1.4.5. Estudios experimentales de los campos magnéticos de muy baja frecuencia, en el subapartado: otros efectos).

Se han desarrollado investigaciones sobre la aparición de trastornos posteriores a la exposición a RF, como dolores de cabeza, (Hocking 1996), malestar general, pérdidas de memoria, nauseas y otras funciones del sistema nervioso central (Von Klitzing 1995, Alpeter 1995, Mann y Röschke 1996). Así como trastornos del sueño y dificultad para concentrarse (Bergqvist y Wahlberg 1994).

II. 2. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

II.2.1. Introducción. Características

A finales del siglo XIX el bacteriólogo alemán Paul Ehrlich observó que administrando intravenosamente algunos colorantes éstos difundían tiñendo todos los órganos excepto el cerebro, lo que interpretó como una falta de apetencia del tejido cerebral por los colorantes.

En 1913 un discípulo suyo, Edwin. G. Goldman, inyectó azul tripan en los ventrículos cerebrales de conejos y perros observando que sí se teñía el cerebro, luego existía una barrera que impedía el paso del colorante desde la sangre al sistema nervioso central; se trataba de la barrera hematoencefálica.

La barrera hematoencefálica (BHE) es un complejo neurovascular que actúa como un filtro permitiendo el paso selectivo de compuestos desde la sangre al cerebro. Esta barrera debe considerarse como un elemento funcional de protección de las células nerviosas. Su alteración presente en diversas patologías cerebrales, conlleva graves daños para la función neuronal (Jolliet y col. 1999).

Mediante esta barrera una amplia gama de compuestos son excluidos del sistema nervioso central (SNC) y no penetran en él. Existen dos razones fundamentales para esta exclusión:

- 1) Las características morfológicas y funcionales de los capilares cerebrales.
- 2) Las características fisicoquímicas de la sustancia que ha de transferirse.

1) La base estructural de la BHE está constituida por la morfología característica del capilar cerebral.

En la figura 1 se representa la estructura morfológica de la barrera hematoencefálica.

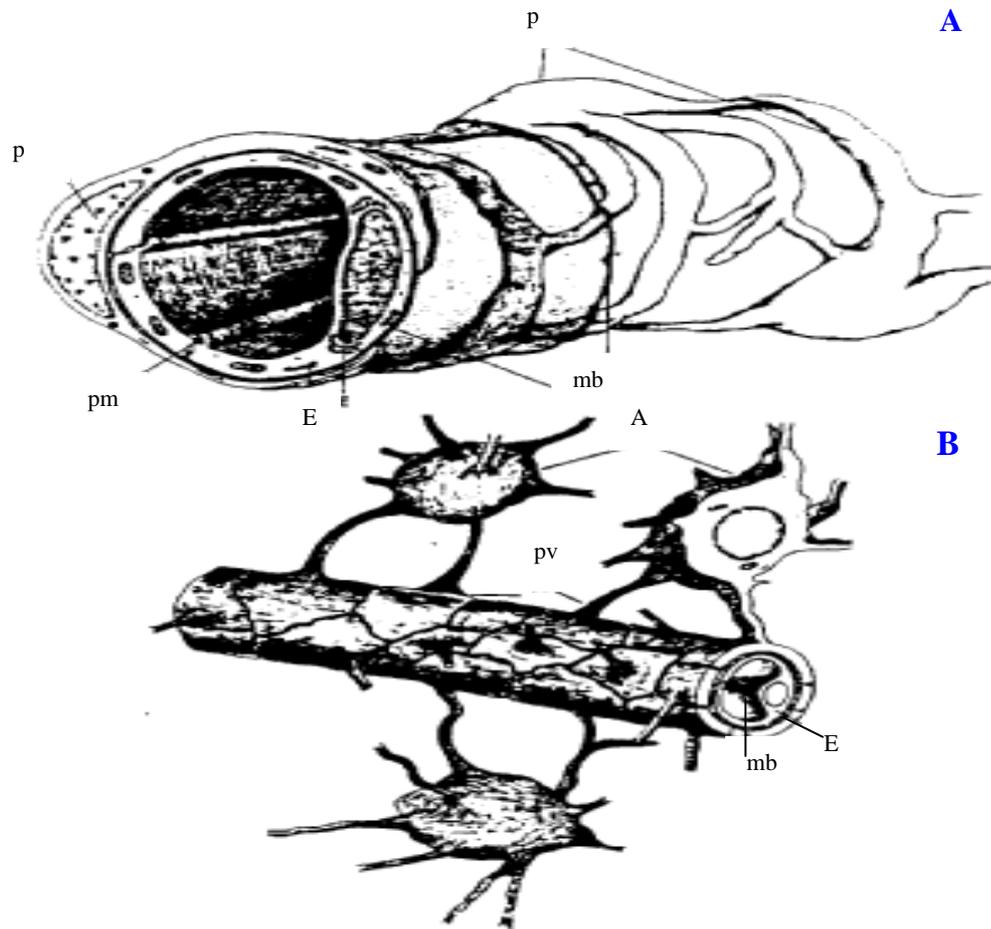


Figura 1. Base morfológica de la BHE.

- A) Esquema tridimensional de un capilar cerebral. E: endotelio; P: pericito; mb: membrana basal; pm: pliegue marginal de la célula endotelial.
- B) Disposición de los astrocitos perivascuales. A: astrocitos, E: endotelio; mb: membrana basal; pv: pies perivascuales.

La pared del capilar está formada por:

- a) un revestimiento endotelial continuo formado por *células endoteliales* íntimamente adosadas sin dejar espacios intercelulares. Estas células presentan numerosas mitocondrias, lo que indica la existencia de procesos activos de transporte. Las vesículas de pinocitosis en estas células sólo se observan en condiciones patológicas (shock endotóxico, hipóxia) a diferencia de lo que ocurre en otras zonas del organismo donde las vesículas son muy abundantes.
- b) el endotelio presenta uniones estrechas, las llamadas “*Gap y tight junctions*” que pueden corresponder desde el punto de vista fisiológico a poros de 15-20 nm (Gap) y 1,5 nm (tight).
- c) la *membrana basal* que forma un revestimiento continuo alrededor de la superficie basal del endotelio.
- d) una capa discontinua de *pericitos*, células en forma de araña cuyas prolongaciones citoplasmáticas siguen un curso circunferencial.
- e) terminaciones aplanadas de las prolongaciones citoplasmáticas de la *glía perivascular*, que se yuxtaponen como las piezas de un mosaico para formar la envoltura glial perivascular, que cubre el 85% de la superficie capilar (Sedlakova y col. 1999, Rubin y col. 1999).

En el sistema nervioso central existen ciertas zonas (órganos circunventriculares) que carecen de barrera hematoencefálica porque sus capilares no presentan esta peculiar estructura de la pared. Constituyen, por tanto, zonas donde las sustancias difunden con facilidad a los espacios tisulares y cumplen funciones quimiorreceptoras y de recepción hormonal.

Los órganos circunventriculares son: eminencia media del hipotálamo, glándula pineal, órgano vasculoso de la lámina terminal, área postrema, órgano subcomisural, órgano subfornical y neurohipófisis.

Existen diversos estados patológicos que pueden alterar la estructura capilar y aumentar su permeabilidad, por ejemplo la isquemia y la anoxia, las lesiones destructivas y proliferativas (traumatismos, neoplasias, sustancias citolíticas, soluciones hiperosmóticas), las infecciones y enfermedades autoinmunes y la pérdida de autoregulación, como puede ocurrir en la encefalopatía hipertensiva, la hipertensión endocraneal, los estados compulsivos y la hipercapnia (Boucher y col. 1998, Suarez 2001).

2) La naturaleza del compuesto que atraviesa la BHE es también importante para su transferencia. Entre las características fisicoquímicas requeridas para el pasaje de compuestos a través de la BHE deben mencionarse el bajo peso molecular y la liposubilidad.

En general la BHE es muy permeable al agua, dióxido de carbono, oxígeno y a la mayoría de las sustancias liposolubles, como el alcohol y la mayoría de los anestésicos; ligeramente permeable a los electrolitos, como el sodio, el cloro y el potasio, y casi totalmente impermeable a las proteínas plasmáticas y a la mayoría de moléculas orgánicas de gran tamaño. Por tanto esta barrera con frecuencia hace imposible lograr concentraciones eficaces de fármacos, como anticuerpos proteicos y fármacos no liposolubles en el parénquima encefálico (Prokai 1998, Saunders y col. 1999a).

II. 2. 2. Mecanismo de transporte

Difusión pasiva

No existen prácticamente ni filtración ni pinocitosis. Por tanto, las sustancias están obligados a difundir a través de la membrana luminal, citoplasma y membrana abluminal de las células endoteliales, membrana basal, pericitos y células gliales.

La BHE se comporta según las leyes físicas de difusión, su permeabilidad depende de gradiente osmótico, presión hidrostática, cargas eléctricas, constante de disociación, tamaño de la molécula, solubilidad en lípidos e índice de captación cerebral.

Las sustancias liposolubles pasan con mayor facilidad la BHE dependiendo de su coeficiente de partición en heptano, así; sustancias de alto coeficiente como O₂, CO₂, xenon, tiopental, aminopirina, etanol, propanol, butanol, nicotina y heroína pasan fácilmente la BHE, dependiendo solamente del flujo cerebral vascular, alcanzando un equilibrio con la sangre en menos de 5 minutos (Johnson y col. 1999).

Las sustancias hidrosolubles tanto ionizables como no ionizables, no dependen del flujo vascular cerebral, sino que dependen fundamentalmente del tamaño de la molécula, ya que su difusión se realiza a través de los poros “Gap y tight junctions”. El agua penetra tan rápidamente como los componentes liposolubles, por ello las hiper e hiponatremias producen respectivamente hiposmolaridad e hiperosmolaridad relativas en el SNC o lo que es lo mismo deshidratación y edema cerebral respectivamente. Las sustancias ionizadas cuyo tamaño excede al del “poro” como es el caso de las sulfamidas traspasan la BHE en virtud de la liposolubilidad de su fracción no ionizada (Rochat y col. 1999, Terasaki y col. 2000).

Transporte activo

Este transporte depende del aporte energético. Se puede bloquear mediante ouabaina.

La membrana plasmática de las células endoteliales posee una desigual distribución de sus bombas iónicas, de modo que las bombas de Na-K o ATPasas Na-K son mucho más abundantes en la superficie abluminal que en la luminal. Estas ATPasas Na-K utilizan una molécula de ATP para liberar tres iones sodio al fluido extracelular cerebral a cambio de dos iones potasio. Estas bombas iónicas eliminan iones sodio que entran en la célula endotelial a través de canales selectivos iónicos en la superficie luminal (Keep y col. 1999) (Figura 2).

SANGRE **ENDOTELIO CAPILAR CEREBRAL** **FLUIDO EXTRACELULAR CEREBRAL**

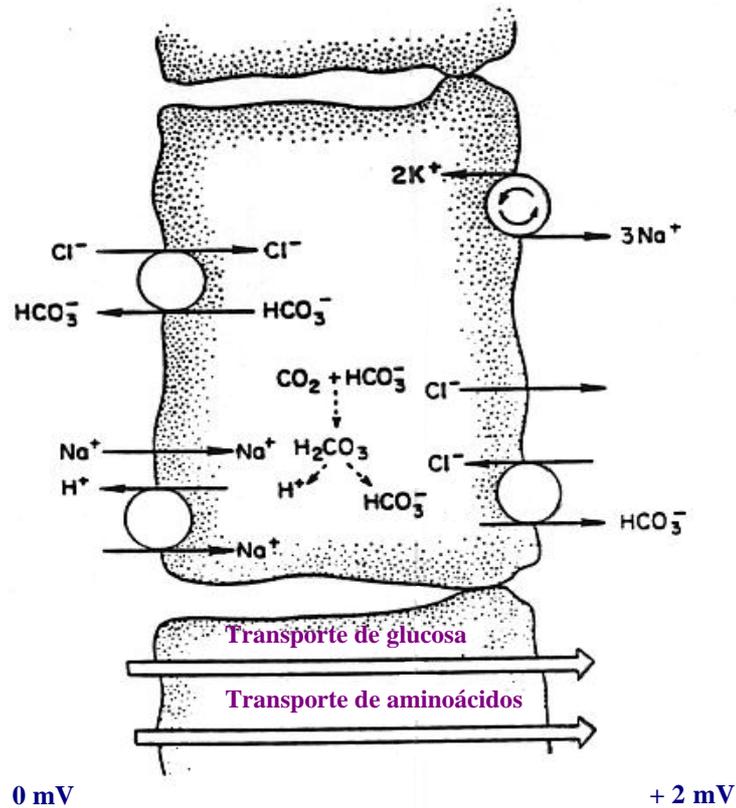


Figura 2. Proceso de transporte a través de las células endoteliales de los capilares cerebrales.

La electroneutralidad se mantiene principalmente por el transporte de los iones cloruro, que entran en la superficie luminal de las células endoteliales mediante intercambio con los iones bicarbonato y son liberados al

espacio intersticial cerebral a través de canales selectivos de cloruro en la membrana abluminal.

El CO_2 del cerebro difunde hacia el citoplasma endotelial, y la carbónico anhidrasa acelera la formación de ácido carbónico. Los iones bicarbonato resultantes se intercambian con iones cloruro en las membranas luminal y abluminal.

Es fundamental que se mantenga la concentración de los constituyentes del fluido extracelular ya que las fluctuaciones de las concentraciones iónicas extracelulares afectan a las propiedades eléctricas de las neuronas y a la transmisión sináptica.

La glucosa, primera fuente de energía para neuronas y otras células debe pasar a través de la BHE para llegar al cerebro. De hecho, el plasma es la única fuente de glucosa cerebral cuya concentración en el fluido extracelular es dos veces la del plasma. La glucosa es transportada al SNC, en función de su concentración plasmática por medio de una proteína transportadora “carrier” que se satura a concentraciones superiores a 4,3 mM. La glucosa se combina con este transportador de la superficie luminal de la célula endotelial que se trasloca a través de la membrana celular y libera la glucosa al medio extracelular cerebral quedando libre para transportar otras moléculas de

glucosa. Al igual que en la membrana celular de los glóbulos rojos el transporte de glucosa a través del endotelio capilar cerebral no es dependiente de insulina (Saunders y col. 1999a, Stark y col. 2000).

Los aminoácidos se necesitan para la síntesis de proteínas, péptidos y neurotransmisores como serotonina, histamina y dopamina. Los aminoácidos son transportados al SNC por un mecanismo de transporte activo estereoespecífico, saturable y competitivo. Se trata de un transporte que necesita energía, es de capacidad limitada, pudiendo competir varios aminoácidos, de estructura similar por un mismo sistema (Pardridge 1998, Ohnishi y col. 2000, Kido y col. 2001). Se han establecido cuatro grandes sistemas:

➤ Sistema L o leucina, transporte para aminoácidos grandes neutros: leucina, fenilalanina, tirosina, metionina, isoleucina, triptófano, histidina, valina, DOPA.

➤ Sistema A o alanina, transporte para aminoácidos pequeños y neutros: alanina, serina, treonina, metionina, asparragina, prolina, glicina, y GABA.

➤ Sistema B o básico, transporte de aminoácidos básicos: arginina, ornitina y lisina.

➤ Sistema DC o dicarboxílico, transporte de aminoácidos ácidos dicarboxílicos: aspártico y glutámico.

Las monoaminas no polares, presentan índices de captación cerebral muy alto (60%), pero la introducción de grupos polares –OH en la molécula produce un fuerte descenso en el índice de captación.

Barrera enzimática

Las enzimas, presentes en la BHE, tienen como misión eliminar por una parte las sustancias, generalmente neurotransmisores, circulantes en la sangre que pudieran pasar al SNC y estimular las sinapsis, y por otra, metabolitos presentes en el SNC que hay que transformar. Estas enzimas son principalmente: Dopa decarboxilasa, monoaminoxidasa y gammaglutamil transpeptidasa (Terasaki y col.2000).

- Dopa decarboxilasa (DOPA-DC): esta enzima realiza el paso de DOPA a DOPAmína, es capaz de decarboxilar concentraciones de hasta 10^{-5} M de sustrato, muy superior a las concentraciones existentes en la sangre.

- Monoaminoxidasa (MAO): Metaboliza las concentraciones mínimas de monoaminas circulantes: MAO-A y noradrenalina.

- Gammaglutamil transpeptidasa (GGT): es un transportador inespecífico de aminoácidos mediante la peptidación de éstos con el terminal –glutamil del glutathion.

II.2.3. Barrera hematoencefalorraquídea

Además de la BHE, en el sistema nervioso central, existe la barrera hematoencefalorraquídea que afecta al libre pasaje de sustancias desde los capilares coroideos al líquido cefalorraquídeo (LCR).

El LCR formado en los plexos coroideos está separado del espacio extracelular cerebral o por la pía-aracnoides o por la membrana ependimaria. Esta separación es prácticamente virtual por lo que puede considerarse el LCR como una prolongación del líquido intersticial cerebral.

Las barreras hematoencefálica y hematoencefalorraquídea no están plenamente establecidas en el momento del nacimiento. Esta es la razón, por la que ciertos metabolitos circulantes, que no son nocivos durante la vida adulta para la función neuronal, lo son en la edad perinatal. En conclusión se puede decir que ambas barreras son elementos fundamentales para la protección de las células nerviosas (Saunders y col. 1999b, Andersen y col. 2000).

A continuación situamos las barreras hematoencefálica y hematoencefalorraquídea en los compartimentos intracraneales e indicamos las zonas cerebrales donde se produce difusión de agua y solutos (Figura 3).

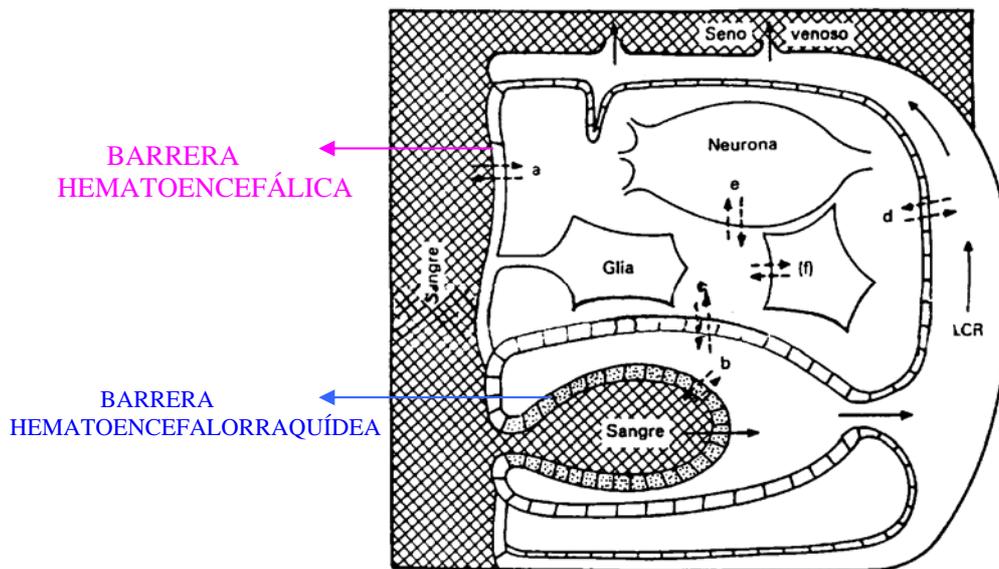


Figura 3. Esquema de los compartimentos intracraneales.

Las flechas continuas señalan la dirección del flujo del LCR. Las flechas discontinuas indican los sitios en donde existe difusión de agua y solutos: a) a través de la barrera hematoencefálica (de capilar a espacio intersticial); b) a través de la barrera hematoencefalorraquídea; c) a través de la membrana endimaria entre el espacio ventricular y el espacio intersticial; d) a través de la piamadre entre el espacio intersticial y el espacio subaracnoideo; e) a través de la membrana neuronal; f) a través de la membrana de las células gliales.

II. 3. IONES DE METALES PESADOS: CADMIO Y MERCURIO

El término “metales pesados” se utiliza en la literatura científica para hacer referencia a los metales tóxicos y se basa en el peso específico de dichos metales, su elevado número de electrones orbitales y las respuestas bioquímicas específicas que provocan en animales y plantas.

Influencia en el medioambiente

Mediante los procesos naturales se liberan elementos procedentes de la corteza terrestre a la litosfera, atmósfera e hidrosfera. Los mecanismos de transporte y transformación de estos elementos, incluidos los metales, implican procesos de reciclaje geoquímico y biológico constituyendo los denominados ciclos biogeoquímicos.

Los ciclos biogeoquímicos están fuertemente influidos por las actividades humanas que son una fuente primordial de contaminación medioambiental por metales pesados. Las principales fuentes antropogénicas son:

- **operaciones mineras** | **explotación de minas**
procesado de minerales
- **efluentes domésticos** | **residuos metabólicos**
corrosión de las conducciones
productos de consumo
- **escorrentías urbanas** | **tráfico**
construcción de carreteras
planificación de la ciudad
- **residuos industriales**
- **combustión de carburantes fósiles**
- **agricultura**

Todas estas fuentes polutivas hacen que aumente la concentración de metales pesados en nuestro entorno, ocasionando problemas de contaminación ambiental, que afectan directamente a la salud humana. En los últimos años ha habido un interés creciente en dilucidar los efectos de los metales pesados en los ecosistemas naturales (Villanueva y Botello 1998, Lau 1998).

El principal problema de los metales pesados es que se acumulan y tienen una larga vida media biológica. La contaminación de la biocenosis por metales pesados se debe a la entrada anormal de los mismos, su transferencia a través de la cadena alimentaria y a la capacidad de acumulación de los

mismos por especies diferentes y a niveles tróficos diferentes (Mudryi 1997, Dietz y col. 2000).

Toxicidad y efectos en el organismo

La exposición a metales pesados provoca numerosos trastornos patológicos, algunos desconocidos, en cuya génesis inciden ciertos factores como: naturaleza del elemento, propiedades físico-químicas y especie química; y por parte del individuo: edad, sexo, raza, dosis, vía de administración, dieta y estado fisiológico.

Los metales ejercen su acción tóxica principalmente sobre las proteínas mediante los siguientes mecanismos: bloqueo de grupos funcionales (-SH, -OH, -NH₂, -COOH e imidazol), desplazamiento de los iones metálicos esenciales y modificación de la conformación activa de su estructura.

Los efectos de los metales in situ, principalmente se producen en los órganos de detoxificación (hígado) y excreción (riñón). La especificidad de órgano y de dosis en las intoxicaciones es característica para cada metal (Ribas 1989, Okazaki y col. 2000).

Esta memoria se va centrar concretamente en el estudio de los metales pesados, cadmio y mercurio. Ambos metales se han elegido por su frecuente contaminación ambiental debido principalmente a las actividades antropogénicas.

II.3.1. Cadmio

II.3.1.1. Introducción

El cadmio es único entre los metales debido a sus diversos efectos tóxicos, su prolongada vida media (aproximadamente 20-30 años en humanos), baja velocidad de excreción del cuerpo y su almacenamiento en tejidos blandos principalmente hígado y riñón.

Los peligros para la salud asociados con la exposición a cadmio se describieron por primera vez en los años cuarenta cuando Friberg (1948) observó la existencia de enfisema y proteinuria en trabajadores expuestos a cadmio. En los años sesenta el cadmio fue uno de los objetivos primordiales de investigación por consejo de la OMS, al haber sido identificado años antes como el principal factor causante de la enfermedad de “itai-itai”. Esta enfermedad afectó a los habitantes de las poblaciones cercanas al río Jintsu en Japón. El origen del cadmio en el río era una mina de zinc situada muy cerca de sus orillas que vertía sus residuos directamente al río, cuyas aguas se utilizaban para regar las plantaciones de arroz. Como consecuencia, la población estuvo expuesta a cadmio a través de la dieta (arroz y agua contaminados).

El cadmio es un contaminante ambiental de elevada presencia en el medio ambiente debido a las actividades industriales y agrícolas, presenta una gran diversidad de efectos tóxicos incluyendo nefrotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad y toxicidades en el sistema reproductor y endocrino.

Aunque el cadmio no es esencial para el crecimiento y desarrollo en mamíferos, generalmente sigue los modelos metabólicos de los elementos esenciales zinc y cobre.

II.3.1.2. Características. Aplicaciones. Fuentes

El cadmio, de símbolo Cd pertenece a los elementos de transición del grupo IIB del sistema periódico. Fue descubierto en 1817 por Friedrich Stromeyer cuando analizaba una muestra de carbonatos en unos hornos de cinc.

Las características más remarcables del cadmio son su gran resistencia a la corrosión, su bajo punto de ebullición y su excelente conducción eléctrica. Los compuestos de cadmio presentan una gran resistencia a los compuestos químicos y a las altas temperaturas. En la tabla 1 se representan las propiedades del cadmio.

Propiedades del Cadmio	
Símbolo químico	Cd
Forma	Blanco, metal suave
Características	Maleable, dúctil y flexible
Punto de fusión	321°C
Punto de ebullición	765°C
Número atómico	48
Peso atómico	112,41
Densidad	8,64 g/cm ³

Tabla 1. Propiedades del cadmio.

El cadmio se utiliza fundamentalmente en la fabricación de baterías recargables de níquel-cadmio. También se utiliza como recubrimiento o tratamiento electrolítico para proteger a otros metales principalmente hierro y acero. Forma aleaciones con plomo, estaño y bismuto para la fabricación de extintores, alarmas de incendios y fusibles eléctricos, ya que disminuye el punto de fusión de los metales con los que forma aleaciones. Las sales de cadmio se usan en fotografía y fabricación de pigmentos y caucho (Stoeppler 1991). Las principales aplicaciones del cadmio vienen representadas en la figura 1.

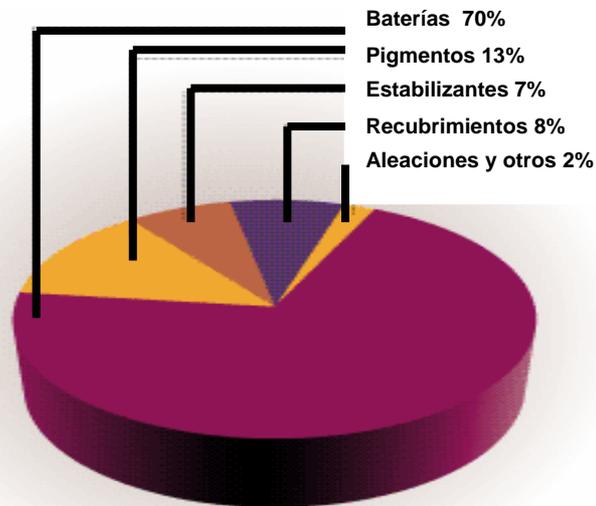


Figura 1. Aplicaciones del cadmio

El cadmio es uno de los componentes de la corteza terrestre y su presencia natural en el medio ambiente se debe a fenómenos como la erosión y abrasión de las rocas. El cadmio también se encuentra de forma natural en aire, agua, suelo y alimentos.

Los niveles de cadmio en el medio ambiente son más elevadas debido a las actividades antropogénicas, como la producción de metales no férricos, la incineración de residuos, la fabricación de fertilizantes fosfatados, la combustión de combustibles fósiles y la producción de hierro y acero (Jones y col. 1993, Morrow 1997).

La producción mundial de cadmio es de 17.000 toneladas/año y la emisión global de los compuestos de cadmio a la atmósfera procedente de fuentes antropogénicas es de 8.000 toneladas/año frente a las 800 toneladas/año correspondientes a las emisiones naturales de cadmio (WHO 1992).

II.3.1.3. Exposición al cadmio

En 1988 se aprobó una resolución por la que las comunidades europeas debían controlar y reducir la contaminación por cadmio para proteger la salud humana y el medio ambiente (Council of the European Communities, 1988). Como consecuencia, desde los últimos 20 años la ingesta diaria de cadmio, para la población general, procedente de todas las fuentes ha venido descendiendo (Figura 2).

En comparación, la OMS establece la ingesta diaria tolerable de cadmio en $60\mu\text{g}/\text{día}$ y $70\mu\text{g}/\text{día}$, respectivamente, para la mujer adulta y el hombre adulto (WHO 1992).

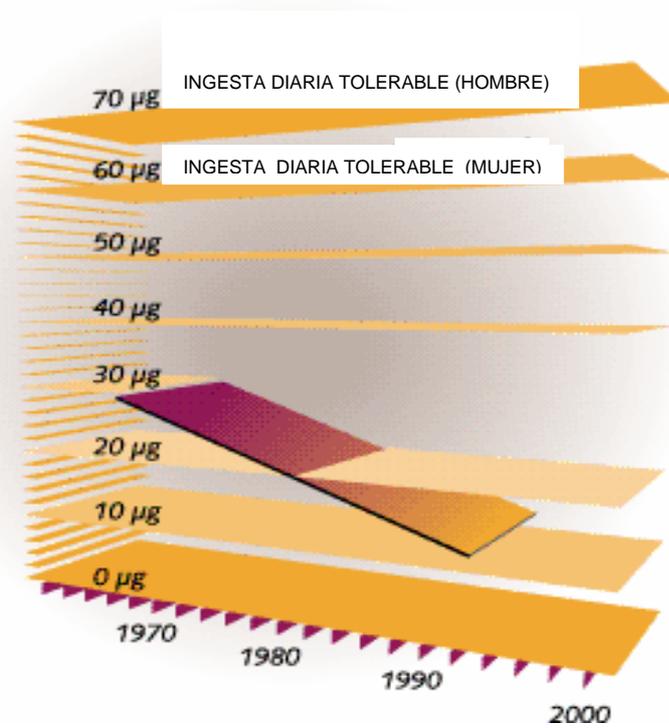


Figura 2. Ingesta diaria de cadmio para la población general.

La exposición humana al cadmio puede ser medioambiental y ocupacional, pero la población general también está expuesta al cadmio debido al consumo de alimentos, agua y cigarrillos. Las emisiones atmosféricas procedentes de fuentes antropogénicas son de un orden de magnitud mayor que las que proceden de fuentes naturales.

Los alimentos, el aire atmosférico y los cigarrillos constituyen las tres principales fuentes de exposición al cadmio para la población general. Este metal está presente en muchos alimentos, siendo los cereales, marisco, hígado

y riñón de animales contaminados los que contienen mayor concentración de cadmio (OECD 1994, Pinot y col. 2000).

La concentración de cadmio en los pulmones de fumadores es aproximadamente el doble que la de los no fumadores. La exposición a cadmio en la atmósfera es despreciable comparada con la proveniente de la ingesta para la población general. En los lugares de trabajo asociados con el uso del cadmio la exposición se debe principalmente a la inhalación de humos o polvos (WHO 1992). La OSHA (Occupational Safety and Health Administration) establece un límite en el medio ambiente laboral de $100 \mu\text{g Cd/ m}^3$ de aire para humos de cadmio y $200 \mu\text{g Cd/ m}^3$ para polvos (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR, 1999).

II.3.1.4. Metabolismo

En humanos la absorción intestinal de cadmio es del 5%, pero factores de la dieta tales como las cantidades de calcio, vitamina D y proteínas influyen en la absorción de cadmio. La administración de vitamina D determina un aumento en la absorción de cadmio y una dieta pobre en proteínas conduce a unos niveles de cadmio más altos.

Datos procedentes de animales y humanos demuestran que la absorción de cadmio vía pulmonar es del 25-50% (Friberg y col. 1986). Otras publicaciones afirman que el 90% del cadmio depositado en los pulmones puede ser absorbido y distribuido a otros órganos críticos como hígado, riñón y testículos (Oberdöster 1986, Waalkes y col. 1990).

Una vez absorbido, el aclaramiento de cadmio a la circulación y su deposición en los tejidos es rápido. Los principales órganos donde se acumula el cadmio son hígado y riñón. También se deposita, aunque en menor medida, en bazo, páncreas, corazón y testículos.

Inicialmente la concentración de cadmio en los riñones es mucho menor que en el hígado, pero va aumentando lentamente con el tiempo ya que se va produciendo una transferencia lenta del metal desde el hígado a los riñones durante la ontogenia.

La vida media del cadmio alojado en la corteza renal es del orden de 18-30 años (Spivey-Fox 1983), lo que pone de relieve la enorme dificultad que tiene el organismo para eliminar este elemento traza. Por tanto, el cadmio se acumula en riñón de forma cada vez más progresiva a medida que transcurren los años, y es en riñón donde, lógicamente, se manifiestan la mayoría de los efectos tóxicos del cadmio.

La principal ruta de excreción del cadmio es vía heces y bilis. Aproximadamente el 95% de la dosis de cadmio oral es excretado por las heces debido a que en el tracto gastrointestinal la absorción de cadmio es muy baja (Sumiyoshi y col. 1999). La excreción urinaria de cadmio puede ser significativa después de producirse daño renal.

II.3.1.5. Mecanismo de acción

De forma general, el modo de acción del cadmio se basa en la competición con otros metales, especialmente con el zinc, calcio, cobre y hierro.

El cadmio desplaza al zinc como cofactor de ciertas reacciones enzimáticas, perturbando sus funciones normales. El cadmio también compite de forma activa con el calcio en los sistemas enzimáticos implicados en la contracción muscular, sobre todo a nivel de las fibras musculares lisas. Asimismo se producen alteraciones en el sistema óseo debido a que el cadmio interfiere en el metabolismo del calcio. También ejerce una acción competitiva con el cobre como cofactor del sistema enzimático de las monoaminooxidasas, disminuyendo su actividad. Del mismo modo el cadmio altera el metabolismo del hierro provocando la aparición de un estado anémico que se caracteriza por un descenso del número de eritrocitos, del

valor hematocrito y una disminución de la concentración de hemoglobina (Liu y col. 1999).

La afinidad del cadmio por numerosos ligandos bajo condiciones fisiológicas ocurre en el siguiente orden: tiol (RS^-) > fosfato (RPO^-) > cloruro (RCl^-) > carboxilo (RCOO^-). El cadmio presenta una gran afinidad por los grupos tiol ($-\text{SH}$), perturbando el metabolismo de los aminoácidos sulfurados y el funcionamiento de numerosas enzimas (ATPasas, deshidrogenasas, anhidrasa carbónica, etc.). La afinidad del cadmio es mayor en biomoléculas que contienen más de un sitio de unión como por ejemplo glutatión y metalotioneína (Quig 1998, Hultberg y col. 1998, García-Arribas y col. 1999a).

El cadmio se almacena sobre todo en hígado y riñón unido a una proteína de bajo peso molecular (7000 D) llamada metalotioneína que se sintetiza en respuesta a la exposición a cadmio. Esta proteína se caracteriza porque tiene un elevado número de cisteínas (20 sobre un total de 60 aminoácidos), por tanto en su molécula existen un gran número de grupos $-\text{SH}$ por los que el cadmio tiene gran afinidad (Nordberg y col. 2000, García-Arribas y col. 2000a, Ribas y col. 2001a).

Estudios realizados “in vivo” e “in vitro” han demostrado que el cadmio induce la formación de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, estas moléculas producen lesión en el DNA y en la membrana celular y un aumento de la peroxidación lipídica (Stohs y col. 2001).

Como consecuencia de la intoxicación por cadmio, se producen alteraciones en diversos procesos metabólicos, modificando la maquinaria energética celular. El cadmio inhibe la fosforilación oxidativa, desacopla reacciones de oxido-reducción y fosforilación en las mitocondrias e inhibe la β -oxidación de los ácidos grasos.

II.3.1.6. Toxicidad del cadmio

Toxicidad Aguda

La intoxicación aguda en humanos puede ocurrir debido a la inhalación (humos y polvos) o ingestión de sales de cadmio. Los pulmones y el tracto gastrointestinal son los tejidos más afectados, según la vía de exposición sea inhalación o ingestión respectivamente. Después de una exposición aguda a dosis elevadas de cadmio también pueden resultar dañados el hígado y el riñón.

Después de la ingestión de cadmio, el primer síntoma es irritación gástrica, posteriormente se producen náuseas, vómitos, salivación, diarrea, calambres abdominales, acidosis metabólica y en los casos más graves sobreviene la muerte.

Después de la inhalación de elevadas concentraciones de cadmio, se producen los siguientes síntomas: irritación pulmonar, dolor en el pecho, náuseas, disnea, mareo, diarrea, con progresión a pneumonitis y edema pulmonar que puede causar la muerte.

Toxicidad Crónica

Los efectos tóxicos de la exposición crónica a cadmio se producen en pulmón y riñón. En la exposición crónica ya sea por inhalación o ingestión, el órgano afectado es el riñón, sin embargo el pulmón solo se afecta después de una exposición por inhalación.

Pulmón

Los principales efectos a largo plazo de la exposición a niveles bajos son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfisema. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica se caracteriza por bronquitis crónica, fibrosis progresiva y daño alveolar conduciendo a enfisema. Los síntomas clínicos

asociados incluyen disnea, reducción de la capacidad vital e incremento del volumen residual (Chambers 1998).

Riñón

Una vez absorbido, el cadmio se acumula principalmente en riñón (sobre todo en la región cortical), aunque también se deposita en hígado y en menor proporción en la mayor parte de los tejidos.

El cadmio provoca disfunción de los túbulos proximales, de forma que se altera el mecanismo de reabsorción de los mismos. Estudios recientes han demostrado que los efectos son reversibles cuando se elimina o reduce la exposición a cadmio (Roels y col. 1997). Sin embargo, cuando la concentración de cadmio en riñón alcanza 200 $\mu\text{g/g}$ el daño tubular que ocasiona es irreversible. Generalmente el primer signo es un aumento en la excreción de proteínas de bajo peso molecular. La proteinuria ha sido observada en trabajadores expuestos a óxido de cadmio (polvo). Las principales proteínas que se encuentran en orina durante la intoxicación con cadmio son β_2 -microglobulinas, inmunoglobulinas, lisozima y ribonucleasa (Goyer 1991, Ikeda 2000). La excreción total de proteínas se puede elevar hasta 10 veces. Esta proteinuria persiste aunque la exposición haya cesado. La

nefropatía inducida por cadmio incluye además de proteinuria, niveles elevados de cadmio en orina, aminoaciduria, glucosuria y fosfaturia.

Hígado

El hígado acumula cadmio después del envenenamiento agudo y crónico lo cual produce daño hepático en ambos tipos de exposición. Los cambios morfológicos después de una única dosis elevada incluyen necrosis de las células del parénquima, deterioro del retículo endoplásmico rugoso, proliferación del retículo endoplásmico liso y cambios degenerativos mitocondriales (Dudley y col. 1982, Al-Nasser 2000). La exposición de ratas a dosis pequeñas diarias de cadmio durante 6 meses provocó daño hepático previo al fallo renal (Dudley y col. 1985). Los efectos en el hígado incluían elevaciones en plasma de las enzimas alanina y aspartato aminotransferasas y descenso de la integridad estructural de los hepatocitos. Estos cambios ocurren cuando la concentración de cadmio en el hígado alcanza 60 µg/g (Novelli y col. 1998).

Efectos en el crecimiento

El cadmio tiene efectos teratogénicos y embriotóxicos, pero estas toxicidades son dependientes de la especie, raza y de la edad de gestación en

el momento de la exposición. El cadmio administrado durante el período de organogénesis en ratas provoca anorexia, retraso en el crecimiento y anomalías en el tejido óseo y en el tubo neural (Nakashima y col. 1988). La placenta es el órgano diana para el cadmio en humanos, éste se acumula en el tejido placentario y provoca daños morfológicos y funcionales (Goyer y Cherian, 1992, Fiala y col. 1998).

Efectos en la reproducción

El cadmio puede actuar sobre el sistema reproductor directamente sobre las gónadas o bien indirectamente actuando sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas. La exposición de los testículos al cadmio provoca daño vascular y edema produciendo hemorragia, disminución de la producción de andrógenos por las células de Leydig, necrosis de las células de Sertoli, inhibición de la espermatogénesis y atrofia testicular. El cadmio inhibe la actividad de la colina acetiltransferasa, disminuye la síntesis de acetilcolina en los espermatozoides y afecta a la movilidad del esperma (Foote 1999, Lafuente y col. 2001).

Estudios en animales muestran que la exposición pre y postnatal al cadmio altera la función ovárica y reduce la producción de estrógenos, provocando cambios en la progresión de la pubertad normal en las hembras.

El mecanismo se debe a la acción directa sobre las enzimas productoras de estrógenos en el ovario o cambios en el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. A dosis suficientemente elevadas el cadmio puede causar necrosis ovárica aguda en ratones (Varga y Paksy 1991).

Tejido óseo

Los efectos más significativos son: osteoporosis y osteomalacia, estos síntomas forman parte del cuadro clínico de la enfermedad de itai-itai, mencionada anteriormente.

Se ha observado también osteomalacia en trabajadores de la industria del cadmio (Goyer 1991). En estudios realizados con ratas hembra expuestas a cadmio se ha encontrado un incremento de la resorción ósea, pérdida de calcio del hueso y disminución de la densidad ósea (Iniesta y col. 1985). En experimentos realizados *in vitro* se ha observado que el cadmio puede actuar directamente sobre el hueso y provocar osteoporosis y osteopenia. Los efectos sobre los huesos son previos al fallo renal (Bhattacharyya 1991, Berglund 2000).

Carcinogénesis

El cadmio está considerado como un carcinógeno humano (IARC 1993) y un potente carcinógeno en animales (Waalkes y col. 1993, Waalkes 2000). El efecto cancerígeno del cadmio se debe a su acción directa genotóxica. El cadmio se intercala entre las hebras del DNA y bloquea la transcripción al desestabilizar la estructura helicoidal del DNA. Inhibe las enzimas DNA polimerasas, induce cambios en la síntesis de DNA, provoca roturas en la hebra única del DNA en células de mamífero, lo que es indicativo de su potencial directo genotóxico (Coogan y col. 1992, 1994, Joseph y col. 2001).

La exposición a cadmio se ha asociado con el desarrollo de determinados tipos de cáncer. Algunos estudios han mostrado una asociación entre la exposición ocupacional a cadmio y el cáncer de pulmón (Lancet 1986, Stainer y col. 1992). También se ha sugerido una relación entre el cáncer prostático en humanos y la exposición ocupacional y medioambiental a cadmio (Bako et al. 1982, Elghany y col. 1990, Ye y col. 2000).

En los estudios realizados en animales, se ha comprobado que la exposición de ratas a inhalación crónica de cadmio (cloruro, óxido) produce carcinoma pulmonar (Glaser y col. 1990). Varios estudios han demostrado que

el cadmio provoca cáncer de próstata en ratas (Waalkes y Rehm 1992). En los testículos, se ha comprobado que una sola inyección de cadmio puede producir un aumento de la incidencia de tumores testiculares. También se ha observado que dosis subcutáneas de cadmio inducen linfoma en ratones (Waalkes y Rehm 1994, Waalkes 2000).

II.3.1.7. Indicadores de la exposición a cadmio

Los indicadores de la exposición a cadmio son:

Cadmio en sangre: Es un indicador de la exposición reciente. El límite biológico de intoxicación está establecido en 5 µg Cd/L de sangre total (American Conference of Government Industrial Hygienists, ACGIH 1996).

Cadmio en orina: Refleja el contenido corporal cuando la exposición es baja, y es un indicador de exposición reciente cuando la exposición alcanza límites elevados. El límite biológico de intoxicación es de 5 µg Cd/g de creatinina (ACGIH 1996, Roels y col. 1999).

Cadmio en heces: Es un indicador de la ingesta diaria.

Cadmio en pelo: Es un indicador del contenido corporal y de intoxicación crónica. El problema que presenta es el no poder diferenciar entre el depósito de cadmio endógeno y exógeno.

Cadmio en riñón y en hígado medido “in vivo”: Desde el año 1981 se está aplicando la técnica de análisis por activación neutrónica para determinar el contenido de cadmio en estos órganos. Es una técnica rápida y no invasiva.

También se pueden realizar otros análisis para completar los anteriores como por ejemplo evaluar la función renal mediante los siguientes parámetros:

β_2 -microglobulina en orina: es un índice ampliamente usado para la evaluación del grado de disfunción renal tubular aunque no es solamente específica de la exposición al cadmio. En condiciones normales la excreción de β_2 -microglobulina es de 25 $\mu\text{g/g}$ de creatinina para el hombre.

Proteínas totales en orina: Se consideran elevadas cuando el valor es mayor de 1 g/L (24 horas), moderadas menor de 1 g/L y críticas cuando es igual o mayor a 0,2 g/L.

II.3.2. Mercurio

II.3.2.1. Introducción

En el año 1953 apareció una extraña enfermedad neurológica que afectó a la población de la bahía de Minamata, en el Sur de Japón. Los síntomas eran una progresiva debilidad muscular, pérdida de visión y deterioro de las actividades cerebrales. Después de numerosas investigaciones descubrieron en 1959 que la causa de esta enfermedad, que pasó a ser conocida como “la enfermedad de Minamata” era el consumo de pescado contaminado con metilmercurio procedente de una industria que utilizaba mercurio como catalizador en la fabricación de plásticos (Futatsuka y col. 2000).

Actualmente muchas personas están expuestas al riesgo de envenenamiento por compuestos mercuriales. Recientemente se está produciendo una contaminación medioambiental por mercurio debido a las actividades de extracción de oro en muchos ríos de la floresta amazónica. El mercurio se emplea en estos procesos como amalgamante para separar las partículas finas de oro de las areniscas (Amouroux y col. 1999, Grandjean y col. 1999, Drake y col. 2001).

II.3.2.2. Características. Aplicaciones. Fuentes

El mercurio, de símbolo Hg (*hydrargyrum*, ‘plata líquida’) es un elemento metálico que permanece en estado líquido a temperatura ambiente, pertenece a los elementos de transición del grupo IIB del sistema periódico. Fue identificado por primera vez por Antoine Laurent de Lavoisier durante sus investigaciones sobre la calidad del aire.

El mercurio es ligeramente volátil a temperatura ambiente y sometido a una presión de 7.640 atmósferas se convierte en sólido. Se disuelve en ácido nítrico y en ácido sulfúrico concentrados, pero es resistente a los álcalis. En la tabla 1 se representan las propiedades del mercurio.

Propiedades del Mercurio	
Símbolo químico	Hg
Características	líquido brillante, color blanco plateado, denso
Punto de fusión	-39°C
Punto de ebullición	357°C
Número atómico	80
Peso atómico	200,59
Densidad	13,6 g/cm ³

Tabla 1. Propiedades del mercurio.

El mercurio ocupa el lugar 67 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. Se encuentra en estado puro o combinado con plata en

pequeñas cantidades, pero es más frecuente encontrarlo en forma de sulfuro, la mena del cinabrio.

El mercurio se utiliza en la fabricación de aparatos de control como termómetros y barómetros, equipos eléctricos y electrónicos, pinturas (como conservante o pigmento), amalgamas para las prótesis dentarias, pesticidas y fungicidas para el tratamiento de las semillas, lámparas de vapor de mercurio, productos de laboratorio, catalizadores, preparación de cosméticos y en la producción de Cl_2 por la electrólisis del cloro-álcali (Langford 1999) (Figura 1).

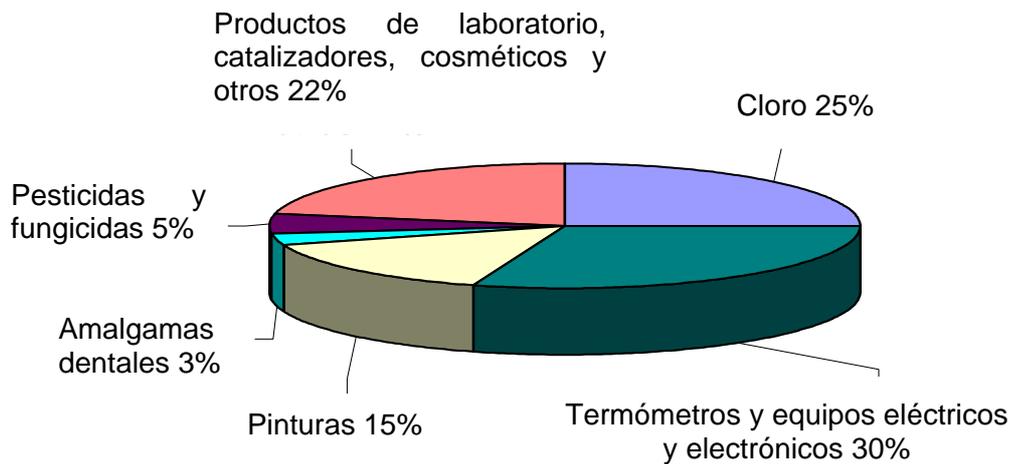


Figura 1. Aplicaciones del mercurio.

II.3.2.3. Distribución, transporte y transformación en el medio

El mercurio es volátil y desprende vapores cuyos iones son transportados a largas distancias a través de la atmósfera causando contaminación local, regional y global.

Actualmente una tercera parte del mercurio que pasa a la atmósfera proviene de las fuentes naturales como volcanes e incendios forestales. Las dos terceras partes restantes proceden de la contaminación causada por las actividades humanas (aproximadamente una tercera parte como producto

secundario de la combustión de combustibles y la otra tercera parte proviene del uso del mercurio en la fabricación de productos).

Cuando el mercurio de origen natural o antropogénico se deposita en los lagos o ríos como Hg^{2+} , éste se reduce a Hg^0 y las bacterias lo transforman en metilmercurio. El metilmercurio se acumula en el plancton y las algas, que sirven de alimento a los peces pequeños, que a su vez son ingeridos por los peces más grandes; así los individuos que se encuentran en lo más alto de la cadena alimentaria pueden llegar a tener una concentración de metilmercurio 130 veces más alta que el agua del entorno. Debido al fenómeno de bioacumulación del mercurio a través de la cadena trófica, el Hg también se acumula en el tejido de cualquier animal o ser humano que se alimente de pescado contaminado (Mahaffey 1999, Cooper y col. 2001, Gerrard y col. 2001) (Figura 2).

Los fungicidas de alquilmercurio aplicados a las semillas son también importantes fuentes originarias de Hg en las cadenas alimentarias terrestres. Éste pasa primero a los roedores y aves que se alimentan de semillas y luego a las aves carnívoras.

La acumulación de mercurio en las cadenas alimentarias acuáticas y terrestres representa un riesgo potencial para el hombre, debido al consumo de estas especies.

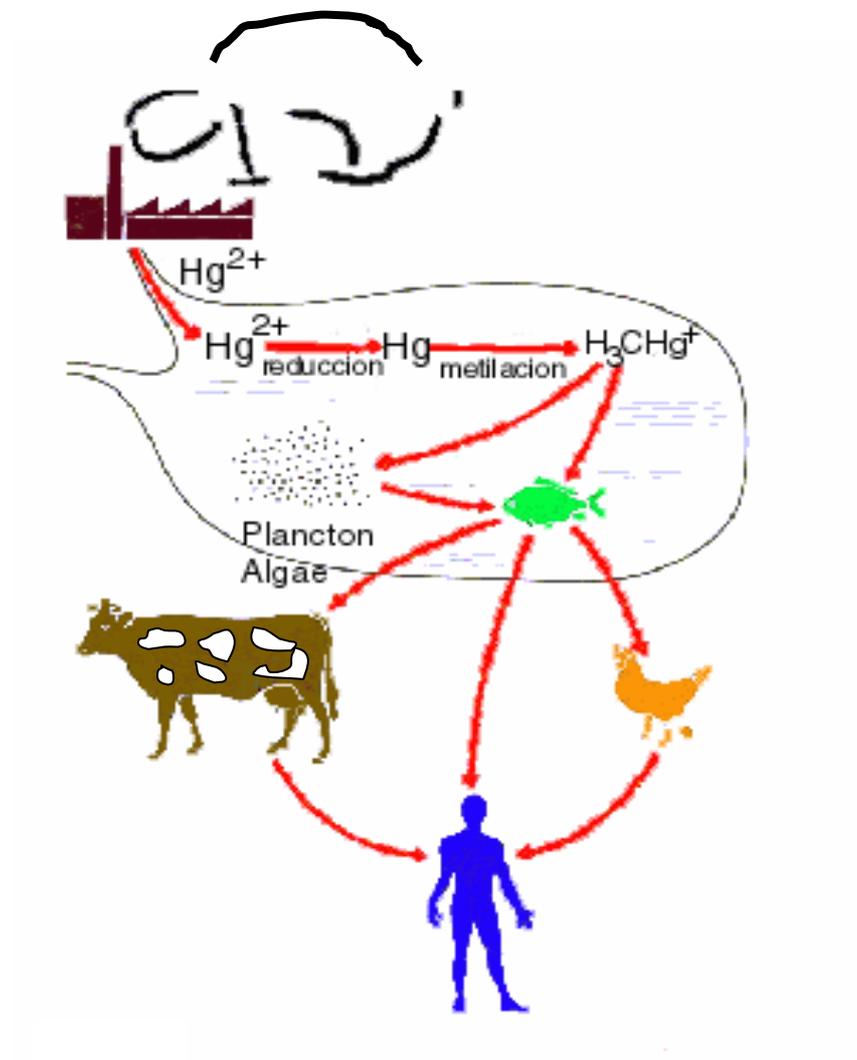


Figura 2. Ciclo biológico y distribución, transporte y transformación del mercurio en la naturaleza.

Las principales formas químicas de mercurio presentes en el medioambiente son:

mercurio elemental, mercurio iónico y metilmercurio (MeHg). En la tabla 2 se relacionan los tres compuestos mercuriales con su fórmula química y la vida media biológica de cada uno en humanos (Satoh 2000).

<i>Compuestos de Hg</i>	<i>Fórmula química</i>	<i>Vida Media Biológica</i>
<i>Mercurio Elemental</i>	Hg ⁰	60 d
<i>Mercurio Iónico</i>	Hg ²⁺	40 d
<i>Metilmercurio</i>	CH ₃ -Hg	70 d

Tabla 2. Principales compuestos de mercurio en el medioambiente.

Estos tres compuestos son altamente tóxicos para los mamíferos incluidos el hombre, el grado de toxicidad depende de la vía de acceso, pulmonar, digestiva o dérmica.

Por regla general, los estados de desarrollo temprano son más sensibles a los compuestos de mercurio. Los compuestos organomercuriales especialmente metilmercurio son más tóxicos que las formas inorgánicas (Langford y col. 1999).

II.3.2.4. Mercurio Elemental

El mercurio elemental existe en el medio ambiente como líquido metálico o mercurio vapor. En la población general la principal fuente de exposición al vapor mercúrico son las amalgamas dentales.

Metabolismo

El vapor de mercurio se absorbe por vía pulmonar (aproximadamente 80%), mientras que el mercurio líquido es absorbido en muy pequeña cantidad por el tracto gastrointestinal (0,01%). Debido a su elevada lipofilia y difusión el vapor de mercurio es transportado rápidamente a través de las membranas celulares.

Cuando se inhala el vapor de mercurio, éste entra en la circulación sanguínea a través de la membrana alveolar y se distribuye rápidamente entre el plasma y los glóbulos rojos.

Después de la exposición a vapor de mercurio, éste se elimina del cuerpo principalmente vía urinaria y fecal (Mercola y col. 2001).

Toxicidad

Los síntomas de una exposición aguda a vapor de mercurio incluye dolor en el pecho, disnea, hemoptisis, lesión de la función pulmonar, pneumonitis intersticial, pudiendo provocar hasta la muerte. La exposición subaguda a vapor de mercurio causa reacciones psíquicas caracterizadas por delirio, alucinaciones e inclinaciones al suicidio (Asano y col. 2000).

La exposición crónica a vapor de mercurio ocurre en el lugar de trabajo. Los síntomas son gingivitis, salivación, estomatitis, temblor y cambios fisiológicos. Los trabajadores expuestos a vapor de mercurio presentan algunos síntomas en el sistema nervioso central como insomnio, pérdida de apetito, irritabilidad y pérdida de memoria. En trabajadores expuestos a vapor de mercurio se ha observado disfunción renal. Se han detectado efectos glomerulares (proteinuria) y tubulares (aumento de la excreción de enzimas tubulares) (Mathiesen y col. 1999, Rossini y col. 2000).

Mecanismo de toxicidad

Los principales órganos diana de la intoxicación de vapor de mercurio son el sistema nervioso central y el riñón.

El vapor de mercurio inhalado persiste en la circulación sanguínea hasta alcanzar la barrera hematoencefálica. Debido a su elevada lipofilia el vapor de mercurio difunde rápidamente a través de la barrera hematoencefálica donde es oxidado a mercurio iónico por el sistema de la catalasa. A nivel molecular se sigue el mismo mecanismo de toxicidad que el mercurio iónico.

Los efectos renales del vapor de mercurio se deben a la presencia de mercurio iónico en el riñón, por la oxidación del mercurio elemental.

II.3.2.5. Mercurio iónico

Acumulación renal y retención

De todos los órganos el riñón es la principal localización de la acumulación mercurio iónico (Hg^{2+}). Se ha demostrado que después de una dosis intravenosa de HgCl_2 , en rata, ratón y conejo, más del 50% de la dosis administrada de Hg^{2+} se acumula preferentemente en las células tubulares proximales del riñón. El pars recta de los túbulos proximales (segmento S3), que es la parte de los riñones más sensible a la toxicidad del mercurio, es el principal sitio para la acumulación de mercurio en el riñón de rata (Zalups 1991, Aschner y col. 2001).

La observación al microscopio electrónico de las células tubulares proximales de riñón de rata después de la administración de HgCl_2 indica una deposición específica de mercurio en los lisosomas. Para la evaluación de la lesión renal provocada por el mercurio es útil la determinación de la fosfatasa alcalina tipo intestinal que es un marcador sensible y específico del segmento S3 de los túbulos proximales en humanos (Nuyts y col. 1992).

Después de la administración de HgCl_2 , el Hg^{2+} es transportado a los riñones como un complejo con glutatión (GSHgSG), que es filtrado a través del glomérulo y llevado hasta las células renales después de la degradación de su molécula de GSH por la γ -Glutamyltranspeptidasa (γ -GTP). Una depleción específica de glutatión hepático que es la principal fuente de glutatión (GSH) plasmático previo a la inyección de HgCl_2 reduce la acumulación renal de mercurio y consecuentemente reduce el daño renal (Tanaka y col. 1990, Wei y col. 1999).

El mercurio acumulado en las células renales induce la síntesis de metalotioneína y se une a esta proteína rica en cisteínas. El Hg^{2+} unido a la metalotioneína es difícilmente liberado al lumen de los túbulos y es retenido en el riñón (Ribas y col. 2001a).

Excreción biliar y urinaria

La excreción biliar de Hg^{2+} es muy baja en comparación con la excreción de metilmercurio. El Hg^{2+} en la bilis es secretado como un complejo con GSH (GSHgSG). El Hg^{2+} se incorpora a los riñones por un sistema dependiente de la γ -GTP, y la inhibición de esta enzima incrementa la excreción urinaria de Hg^{2+} (Zalups y col.1999).

Toxicidad

El Hg^{2+} causa nefropatía severa, caracterizada por una extensiva pérdida de la función de los túbulos proximales. La toxicidad renal del Hg^{2+} puede estimarse por el incremento en los niveles urinarios de enzimas biomarcadoras como láctico deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa y γ -glutamyltranspeptidasa.

De estas enzimas marcadoras, la fosfatasa alcalina y la aspartato aminotransferasa son los indicadores más sensibles y la láctico deshidrogenasa es el marcador más característico de la toxicidad renal de mercurio (Dieter y col. 1992).

La lesión glomerular también se observa en el riñón de rata después de una dosis elevada de HgCl_2 . Sin embargo la magnitud de la lesión observada

en el glomérulo es menor que la de los túbulos. Aunque la exposición a una dosis única y elevada de Hg^{2+} produce daño directamente en los riñones, una exposición crónica a dosis bajas de Hg^{2+} induce a una enfermedad glomerular inmunológica.

Mecanismo de toxicidad

Unión a los grupos tioles

El Hg^{2+} tiene una gran afinidad por los grupos tiol (SH), por tanto puede unirse a grupos SH que forman parte de macromoléculas esenciales e inhibir su acción biológica. En los tejidos el Hg^{2+} se puede unir también a GSH y formar GSHgSG . El GSH celular está implicado en la toxicidad del mercurio, un descenso en la concentración celular de GSH puede incrementar la presencia de mercurio activo que puede reaccionar fácilmente con macromoléculas esenciales.

Producción de especies reactivas de oxígeno

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el mercurio induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno que pueden provocar

lesión en el DNA (Brawer y col. 1998, Hussain y col 1999, Schurz y col. 2000).

Efecto sobre la función de membrana

La membrana de las células renales es la primera diana de la toxicidad del mercurio. Vanhoek y col. en 1990 mostraron que el mercurio incrementa la permeabilidad del NaCl y urea e inhibe la permeabilidad al agua de la membrana con borde en cepillo de las células renales en ratas.

Se ha demostrado también que la permeabilidad de los liposomas a la glucosa se incrementa con una concentración baja (10^{-7} M) de Hg^{2+} , sugiriendo que los lípidos de membrana podrían ser una de las principales dianas del Hg^{2+} .

Homeostasis del Calcio

En ratas inyectadas con HgCl_2 se observó un incremento en la concentración renal de calcio, que se relacionó con un aumento de urea en sangre. Se ha detectado en la mitocondria renal de rata un efecto estimulador del Hg^{2+} en la liberación de Ca^{2+} mitocondrial. Chavez y sus colaboradores concluyeron que la liberación de calcio inducida por Hg^{2+} era debido a la

modificación de los grupos sulfidrilo de las proteínas de la membrana mitocondrial (Chavez y col. 1989).

Peroxidación Lipídica

La administración de Hg^{2+} induce peroxidación lipídica en el riñón que viene acompañada de un descenso en la concentración renal de GSH (Sin and Teh 1992, Zalups and Lash 1990). Lund y col. (1991) demostraron que el Hg^{2+} reduce el glutation mitocondrial y aumenta la formación de H_2O_2 en la mitocondria renal cuando hay una lesión en la cadena de transporte electrónico.

Reacción Autoinmune

En algunas especies como ratas, ratones, conejos y en humanos el Hg^{2+} induce a una enfermedad glomerular inmunológica denominada glomerulonefritis autoinmune caracterizada por depósitos de inmunoglobulina G a lo largo de la membrana basal glomerular (Druet y col. 1991, El-Fawal y col. 1999).

Factores modificadores de la toxicidad

La metalotioneína renal puede unirse a Hg^{2+} y suprimir su acción tóxica en las células renales. El GSH puede ser también un factor importante de la toxicidad del mercurio. La depleción de GSH por el tratamiento del ratón con un inhibidor de la síntesis de GSH aumentan la toxicidad del HgCl_2 (Naganuma y col. 1990, Tandon y col. 2001).

El Selenio es un elemento traza esencial que tiene efectos protectores contra la toxicidad del mercurio. La coadministración de un compuesto de selenio con Hg^{2+} produce una disminución de la toxicidad aguda del Hg^{2+} a través de la formación de complejos estables de mercurio y selenio en varios tejidos como hígado y riñón.

II.3.2.6. Metilmercurio

Generalmente los compuestos orgánicos mercuriales son aquellos que tienen un enlace C-Hg como metilo, etilo, fenilo etc. De estos compuestos orgánicos el metilmercurio es el más resistente a la biodegradación y la población general está expuesta a este metal a través de la dieta, sobre todo pescado donde el mercurio se encuentra fundamentalmente en la forma de

metilmercurio. El MeHg es la forma más abundante de mercurio orgánico en el medioambiente.

La mayor parte de los síntomas que se conocen parten de los estudios de las epidemias provocadas por ingestión de pescado contaminado y de estudios de exposición ocupacional (Myers y col. 2000).

Toxicidad

Neurotoxicidad

El daño neuronal causado por el MeHg se limita al sistema nervioso central (SNC). En el adulto humano las áreas dañadas del cerebro están muy localizadas: córtex visual y la capa granular del cerebelo. Observaciones neuropatológicas han mostrado que tanto en el cerebro como en el cerebelo aparecen focos de necrosis neuronal con procesos de lisis celular, todo ello conduce a una atrofia cerebral generalizada (Pedersen y col. 1999).

La toxicidad específica del metilmercurio en el SNC se debe a su paso relativamente fácil a través de la barrera hematoencefálica y la incapacidad de las células nerviosas de reparar el daño celular causado por el MeHg.

Minnema y col. (1989) observaron un incremento en la liberación espontánea de varios neurotransmisores como dopamina y acetilcolina en los

sinaptosomas de cerebro de rata, lo que sugiere que el MeHg produce un aumento de la permeabilidad de la membrana sinaptosomal.

El efecto neurotóxico se manifiesta como un entumecimiento de la boca y extremidades, dificultad para articular palabras, sensación generalizada de debilidad, fatiga, pérdida de visión y audición y finalmente coma y muerte.

Toxicidad renal

El riñón es uno de los principales órganos donde se acumula el MeHg. El MeHg se puede incorporar a las células renales a través de dos mecanismos, uno es a través de la membrana en borde de cepillo después de la filtración glomerular y la otra ruta es a través de la membrana basolateral desde el capilar peritubular.

Toxicidad en el desarrollo

El cerebro en desarrollo es más sensible al MeHg que el cerebro adulto. Rodier y col. (1984) y Sager y col. (1982) demostraron que el MeHg detiene la división celular durante el desarrollo del SNC en embriones de ratones expuestos a MeHg. La exposición postnatal temprana a MeHg parece inhibir el desarrollo y maduración del cerebro. Choi y col. (1981) observaron una

ramificación incompleta del árbol dentrítico de las células de Purkinje en ratones expuestos a MeHg en período postnatal temprano.

Mecanismo celular y molecular

El MeHg produce alteración específica de las estructuras de microtúbulos e inhibición de la síntesis de tubulina (Kasama y col. 1989). Los microtúbulos están asociados con muchas funciones celulares por ejemplo, mitosis, movimiento celular y fagocitosis por ello la alteración de su estructura producida por el MeHg da lugar a varios tipos de alteraciones celulares dependiendo de las funciones de los microtúbulos en cada tipo celular.

El MeHg también induce la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden provocar lesión en el DNA (Close y col. 1999).

II. 3.2.7. Evaluación del riesgo para la salud

Respecto a la evaluación del riesgo del mercurio atmosférico podemos señalar que:

Por debajo de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no se han podido establecer de forma inequívoca efectos adversos.

De 10 a 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ se ha observado el llamado micromercurialismo (síndrome asténico –vegetativo).

A concentraciones entre 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ aparecen los primeros síntomas de anorexia, pérdida de peso, insomnio, nerviosismo, vértigo, cambio en la conducta y trastornos psíquicos no observándose sin embargo los síntomas clínicos de la tesarismosis de mercurio.

A concentraciones de mercurio ambiental iguales o superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, se han observado los primeros signos de envenenamiento crónico en el sistema nervioso como temblores y mercurialismo.

La OSHA ha establecido límites en el medio ambiente laboral de 0,1 mg Hg orgánico/ m^3 aire y 0,05 mg Hg elemental/ m^3 ·aire, para 8 horas de jornada laboral (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR 1999).

II.3.2.8. Indicadores de la exposición a mercurio

Mercurio en sangre: Es un buen indicador para la valoración del contenido corporal de mercurio en la exposición crónica a niveles bajos.

El límite biológico es de 15 μg Hg/L de sangre (American Conference of Government Industrial Hygienists, ACGIH, 1996).

Mercurio en orina: Es el análisis de rutina más indicado para la evaluación de la exposición laboral. El límite biológico es de 35 µg Hg/g creatinina (ACGIH, 1996).

Mercurio en pelo: La concentración de mercurio en pelo depende mucho del consumo de pescado.

Se ha utilizado también para la evaluación de la exposición al mercurio, su determinación en saliva, uñas y sudor.

También se pueden realizar otros tipos de análisis para determinar la exposición al mercurio:

Análisis de la actividad enzimática lisosomal en suero.

Determinación de grupos -SH en suero.

Determinación de enzimas y glutatión en eritrocitos.

Determinación de proteínas en orina.

Ensayos psicológicos y de conducta.

Evaluación de los signos de temblor y función neuromuscular.

III. OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es estudiar el efecto biológico de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y de radiofrecuencia (2,45 GHz) relacionándolo a su vez con el de los metales pesados cadmio y mercurio, siguiendo así las recomendaciones del Parlamento Europeo que aconseja investigar fenómenos de sinergia entre campos electromagnéticos y agentes químicos ambientales.

Los objetivos concretos que se plantean son:

- 1.- Estudiar el efecto biológico de los campos magnéticos de muy baja frecuencia 50 Hz y diferentes intensidades 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT) y 1,5 A (9,7 mT) en linfocitos humanos de sangre periférica incubados durante 72 horas. Concretamente se determina la proliferación celular y se evalúa el efecto genotóxico mediante la técnica de inducción de micronúcleos.
- 2.- Analizar el efecto combinado de los campos magnéticos de 50 Hz e intensidades 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT), 1,5 A (9,7 mT) y los metales

pesados cadmio y mercurio, mediante los ensayos de proliferación celular e inducción de micronúcleos.

3.- Evaluar el efecto de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y diferentes intensidades: 0,25 A (1,6 mT), 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT) en sangre humana durante varios tiempos de exposición desde 0 a 72 horas, mediante el análisis de parámetros bioquímicos y enzimáticos.

4.- Determinar el efecto de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y 27,5 G (2,75 mT) sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en cerebro de ratón.

5.- Estudio del efecto sinérgico entre los campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT) y una sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de cerebro de ratón.

6.- Investigar la variación de las propiedades eléctricas conductividad y permitividad de varios tejidos de rata mediante la aplicación de campos electromagnéticos de radiofrecuencia, concretamente 2,45 GHz, después de someter a los animales a un tratamiento con sobrecarga de cadmio y de mercurio respectivamente.

7.- Establecer una relación entre las variaciones de la permitividad y conductividad de los diferentes tejidos con los parámetros sanguíneos obtenidos del análisis de sangre realizado a los animales y con la cantidad de metal presente en cada tejido.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1. APLICACIÓN DE CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz).

IV.1.1. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) en linfocitos. Posible sinergismo con metales pesados: cadmio y mercurio.

IV.1.1.1. Sistema de generación de campos magnéticos de 50 Hz e intensidad variable.

A) Diseño y caracterización de la cámara.

El campo magnético (CM) se genera en el interior de un arrollamiento cilíndrico de radio 7,5 cm y 58 cm de longitud, de hilo de cobre, diseñado y construido por el Departamento de Física Aplicada III, de la Facultad de Físicas de la Universidad Complutense de Madrid. Con objeto de uniformizar el campo en el interior, se incrementa el número de espiras en los extremos del cilindro. La longitud total del hilo de cobre empleado es de 1.814 m, con una resistencia total de 31 Ω . La Figura 1 muestra el sistema experimental

para la generación de campos magnéticos de intensidad variable a la frecuencia de 50 Hz. La corriente en el arrollamiento se limita a 1 A, valor máximo admisible por el autotransformador, correspondiendo a esta corriente una intensidad de campo magnético de 65 G, que es 130 veces el campo terrestre (0,5G). El sistema dispone también de un gausímetro para controlar la intensidad de campo magnético dentro de la cámara.

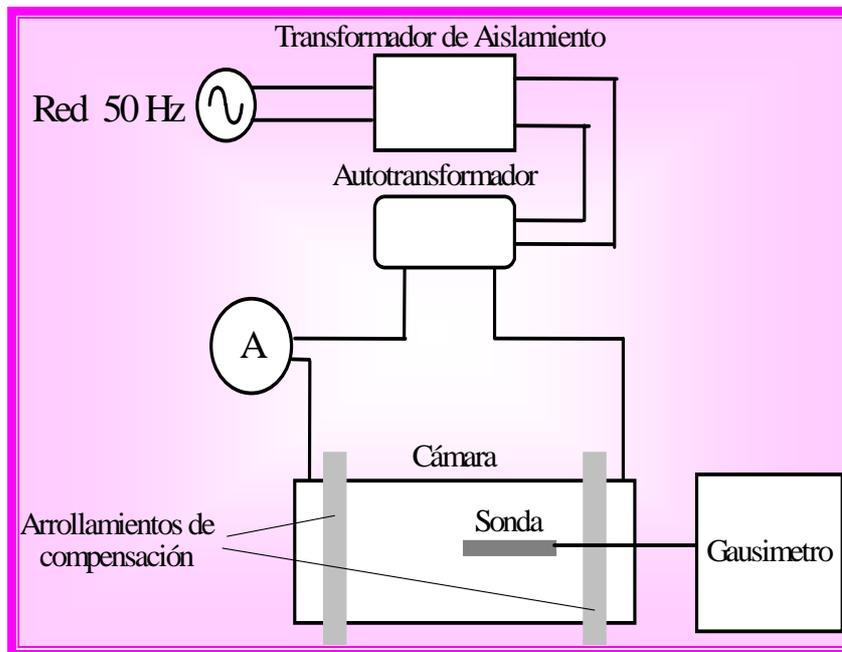


Figura 1.- Dispositivo experimental para la generación de campos magnéticos de 50 Hz e intensidad variable.

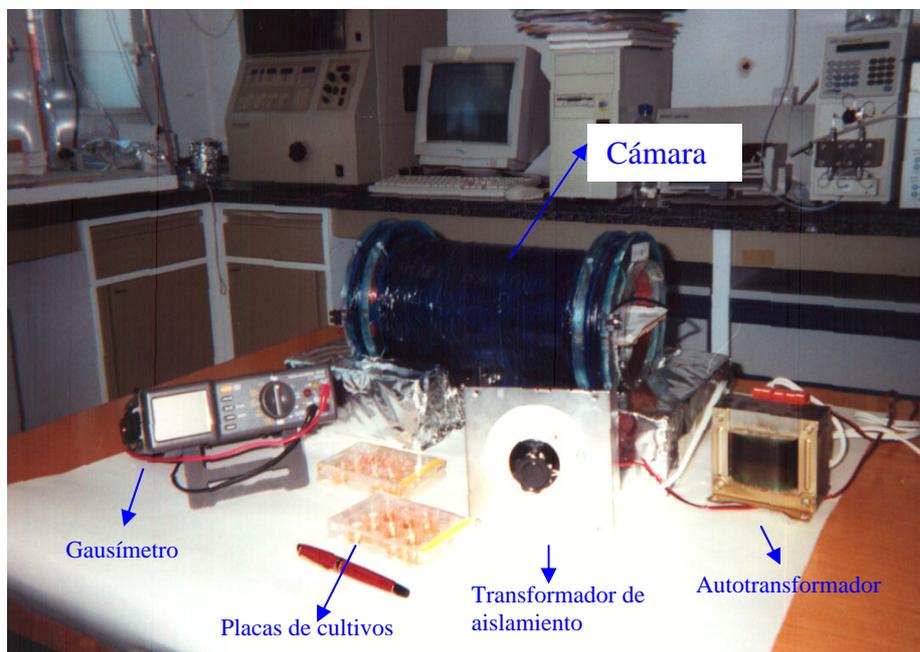


Figura 2. Dispositivo experimental para la generación de campos magnéticos.

B) Calibración de la cámara.

La calibración de la cámara se realiza en puntos situados a lo largo de distintos ejes longitudinales en el interior de la cámara y separados entre sí 2 cm. Los ejes medidos son cinco: a) el eje central, b) dos ejes situados a ambos lados del eje central a una distancia de 2 cm y c) dos ejes situados a ambos lados del eje central a una distancia de 4 cm. La grátícula obtenida para la distribución de intensidad del campo magnético en el interior del solenoide permite la posterior colocación precisa de las muestras y asegura la repetitividad de las medidas.

La Figura 2 muestra la variación del campo magnético B en gauss (G) con la distancia a lo largo de los ejes seleccionados, para una corriente de 0,5 A correspondiendo a una intensidad de campo de 32 G (3,2 mT).

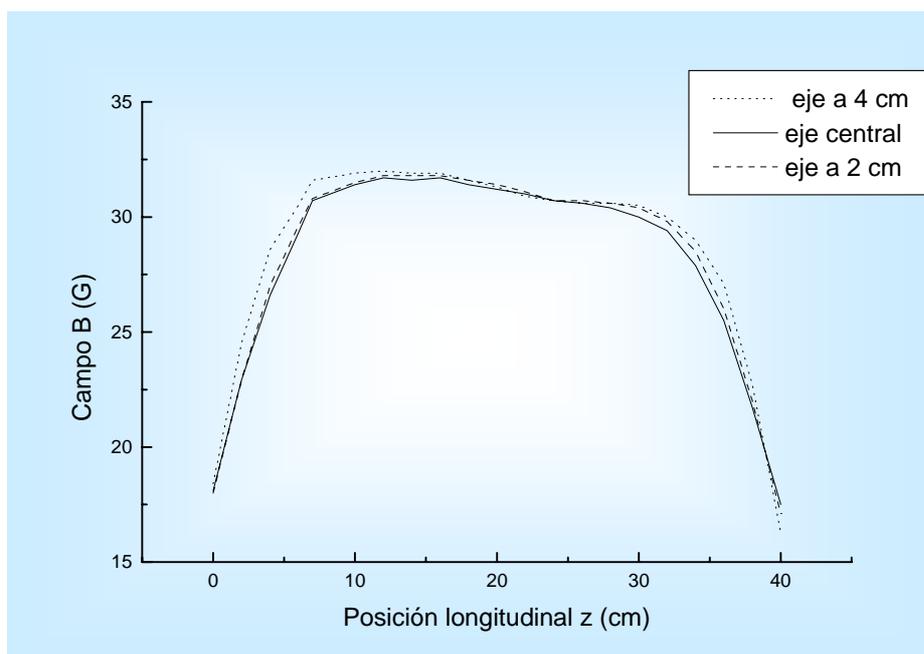


Figura 2. Distribución de campo magnético en el interior de la cámara.

Se observa una buena uniformidad del campo en el rango 8 - 32 cm en la dirección longitudinal, lo que proporciona un espacio útil de 24 x 10 cm para la colocación de muestras con una variación en la intensidad de campo inferior al 1,5% en toda la región.

Para la realización de los experimentos la cámara de campos magnéticos se introduce dentro de una estufa a 37°C (Figura 3).

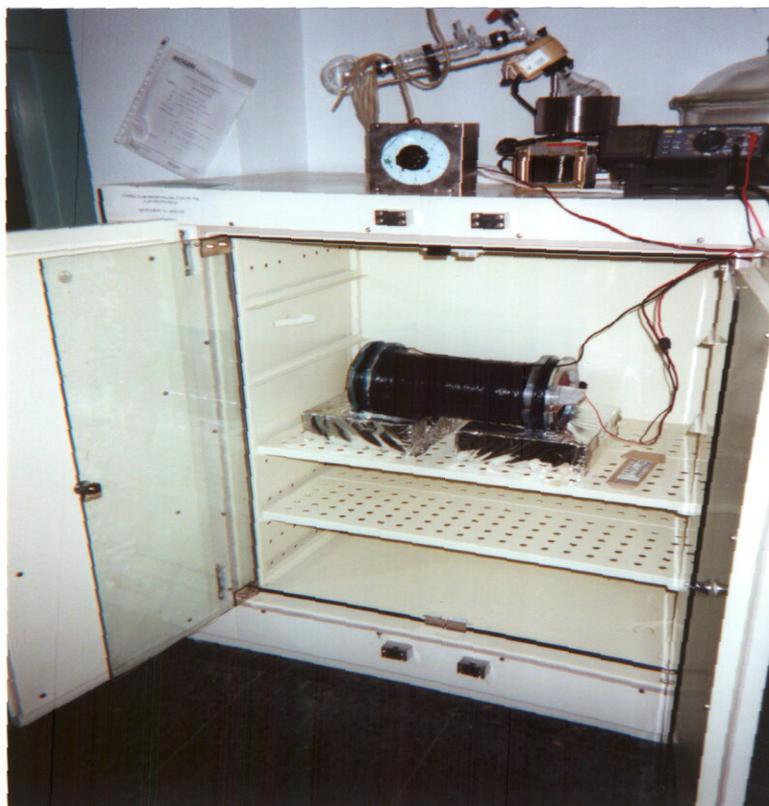


Figura 4. Cámara de campos magnéticos introducida en el interior de una estufa a 37°C.

IV.1.1.2. Obtención de linfocitos.

Los linfocitos se obtienen de sangre periférica humana, procedente de un solo donante voluntario, como control de calidad y homogeneidad en los resultados. Se extraen 20 ml de sangre en dos tubos de 10 ml con heparina-litio (Eurotubo). En una cabina de flujo laminar se trasvasa el

contenido de los tubos heparinizados a dos tubos de plástico estériles de 50 mL y se diluye con 10 mL de disolución salina-fosfatos (PBS) tamponada a pH 7,2 cuyo contenido se mezcla por inversión.

Se preparan otros dos tubos estériles de 50 ml con 10 ml de “lymphocytes isolation solution” (Rafer, S.L. España). Con la ayuda de una pipeta estéril se añade lentamente la mezcla de sangre-PBS a los tubos que contienen la disolución de separación de linfocitos. Se forman dos fases, en la parte de abajo esta el aislante de linfocitos (transparente), y en la parte de arriba la mezcla sangre-PBS (rojo).

Se centrifugan ambos tubos a 1.900 rpm durante 20 min, se toma la banda grisácea de linfocitos con pipeta estéril y se añade a otro tubo estéril con 20 ml de PBS para su lavado por dos veces mediante centrifugación a 1.900 rpm durante 5 min en centrífuga refrigerada 0-4°C.

Finalmente se añade a los linfocitos medio de cultivo completo RPMI 1640 con 20% de suero fetal, 100 IU/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 5% de glutamina y se cuentan en cámara cuentaglóbulos.

Después se distribuyen en dos placas estériles de 12 pocillos. Una de las placas es la control y la otra se introduce en la cámara de campos magnéticos.

IV.1.1.3. Optimización del tiempo de incubación en la cámara de campos magnéticos.

En los cultivos celulares de linfocitos se utiliza fitohemaglutinina (Phytohemaglutinin; PHA) (Boehringer Mannheim Biochemical), un potente inductor de mitosis en linfocitos, y por tanto estimulante de su división celular.

Con objeto de establecer el tiempo correcto de incubación de los linfocitos a 37°C y la concentración óptima de fitohemaglutinina para el crecimiento celular, se añade timidina tritiada que se incorpora directamente al DNA y es considerado un marcaje radioactivo de la sucesiva duplicación del DNA, material genético y de la división celular.

Se extraen 20 ml de sangre humana periférica del donante habitual y se aplica la técnica señalada anteriormente para el aislamiento de linfocitos. Se dispone de 12 millones de linfocitos que se diluyen en 1,2 ml de medio y se tiene una suspensión de 1 millón de células/100 µl que se vierten en cada uno de la serie de pocillos (1×10^6 células); y la dilución a la mitad para la segunda serie de pocillos ($0,5 \times 10^6$ células). Ambas series se completan con medio de cultivo para un volumen final de 1 ml/pocillo.

Se prepara una disolución de fitohemaglutinina (PHA) en proporción de 10 mg PHA/10 ml, y después se diluye 1/10. De esta disolución se colocan en los pocillos por triplicado las concentraciones de: 50µl/pocillo= 1/100; 10µl/pocillo= 1/500; y 5µl/pocillo = 1/1000, excepto en los pocillos control que carecen de fitohemaglutinina.

Se preparan 4 placas, con los experimentos de cada dilución por triplicado, y se añade timidina tritiada para detectar el crecimiento y división por duplicación del DNA celular 15 horas antes de sacar cada una de las placas a las 24, 48, 72, y 96 horas de incubación. Se colocan en el congelador hasta que finaliza la incubación total de las 4 placas, y se sigue la siguiente metodología hasta el conteo de la radioactividad.

Descongeladas las placas se someten a sistema de filtración y lavado a vacío a través de filtros. Cada uno de los filtros retiene las células, que después se lavan para eliminar la radioactividad externa sobrante. Se coge cada uno de los filtros con pinzas romas y se introducen en los tubos colocados en viales apropiados, finalmente se añaden 2 ml de líquido de centelleo (Aquasol) y se someten a conteo durante 1 minuto en Contador Beta para ^3H .

Finalizado el conteo de la timidina tritiada se construyen las gráficas, en el eje de ordenadas se representan las cuentas por minuto (cpm) de ^3H -tim, y en abcisas la dilución de la concentración de fitohemaglutinina (PHA) y tiempo de incubación en horas.

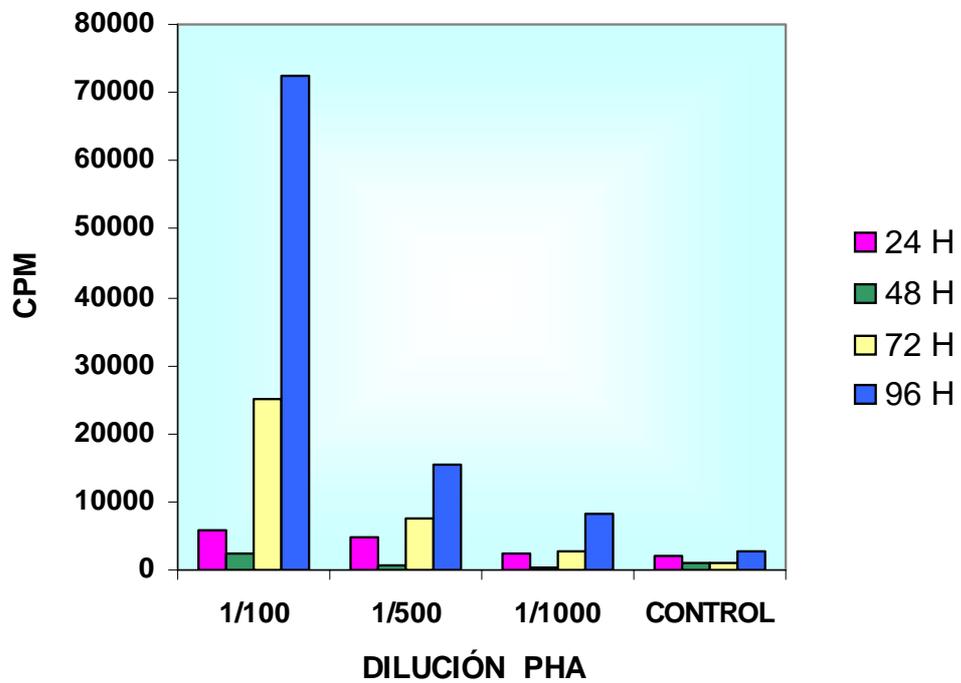


Figura 4. Incorporación de H^3 -Timidina en cultivos de linfocitos humanos de 1.000.000 de células.

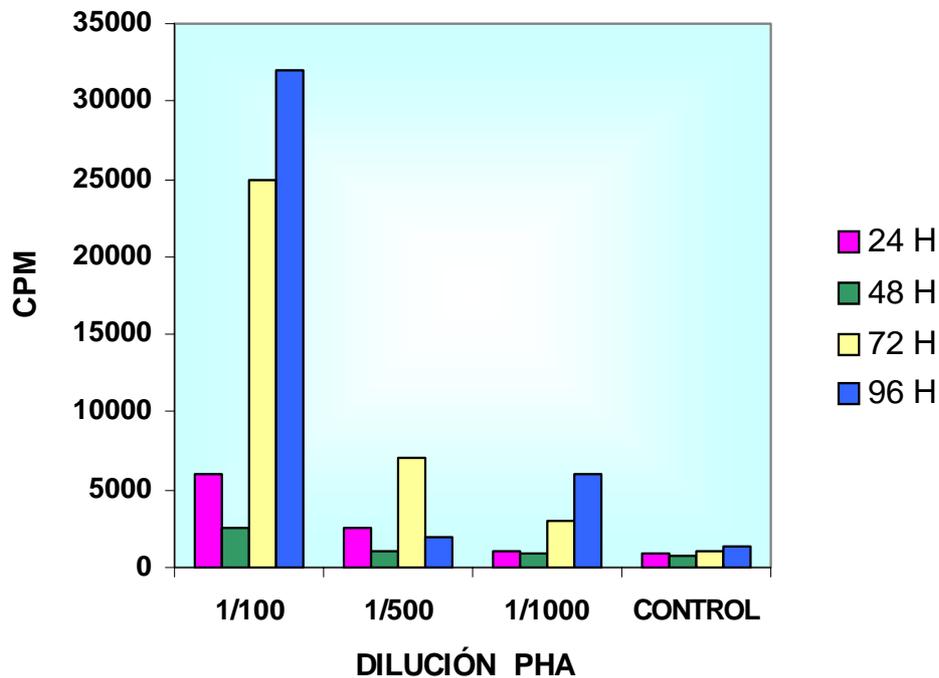


Figura 5. Incorporación de H^3 -Timidina en cultivos de linfocitos humanos de 500.000 células.

Los histogramas que representan la fijación de 3H -tim en cpm frente al tiempo de incubación en horas (figuras 4 y 5) nos permiten establecer que el tiempo óptimo de incubación ocurre a las 96 horas. En las gráficas se observan las diferencias en cuentas por minuto (cpm) de la timidina tritiada, en los cultivos de linfocitos de 500.000 células ($0,5 \times 10^6$ células/pocillo) y en los cultivos de 1.000.000 de células (1×10^6 células/pocillo) por pocillo en placa de 96 pocillos. Observamos en ordenadas las cpm de 3H -tim en los cultivos de linfocitos después de 24h, 48h, 72h y 96h de incubación con diferentes concentraciones de fitohemaglutinina (PHA), y obtenemos que el

crecimiento es superior a la concentración más elevada de PHA, es decir a la dilución 1/100 después de 96 horas de incubación.

IV.1.1.4. Cultivos celulares. Incubación de las células con diferentes concentraciones de iones cadmio y de mercurio.

Se extraen 20 ml de sangre humana del donante habitual y se aplica la técnica señalada anteriormente para el aislamiento de linfocitos. Los linfocitos obtenidos se diluyen con el mismo medio de cultivo anterior para su distribución en dos placas de 12 pocillos cada una.

En cada placa de 12 pocillos se utilizan tres pocillos controles que no contienen disolución de metal, a los que posteriormente se añade una suspensión de linfocitos en el mencionado medio de cultivo. En cada placa de 12 pocillos se utiliza un pocillo con medio y sin células al que denominamos blanco.

A cada pocillo control se le añade 1.000.000 de células suspendidas en el medio de cultivo y fitohemaglutinina a la concentración final de 10 µg/ml, para la inducción de la división celular.

En los pocillos tratados, se añade 1.000.000 de linfocitos, fitohemaglutinina a una concentración final de 10 µg/ml y además se añade una concentración determinada de metal en los pocillos que varía de 10^{-3} M a 10^{-7} M.

Para el tratamiento de los linfocitos con los iones metálicos cadmio y mercurio se utilizan los compuestos:

- Cloruro de Cadmio monohidrato: $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck).
- Cloruro Mercúrico: HgCl_2 (Merck).

Las propiedades del cloruro de cadmio monohidrato se presentan en la tabla 1:

<i>$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$</i>	
<i>N°CAS</i>	35658-65-2
<i>Peso Molecular</i>	201.32 g/mol
<i>Densidad específica (20°C)</i>	4 g/cm ³
<i>Solubilidad en agua (20°C)</i>	Fácilmente soluble
<i>PH (50g/L, H₂O, 20°C)</i>	6.7
<i>Punto de fusión</i>	150-158°C
<i>Punto ebullición</i>	960°C
<i>R45-E48/23/25</i>	Carcinogénico, tóxico, riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por inhalación, contacto con la piel e ingestión.
<i>DL₅₀ oral rata</i>	88 mg/kg

Tabla 1. Propiedades del $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

El cloruro de cadmio se utiliza en fotografía, pinturas, imprenta, galvanoplastia, fabricación de espejos y lubricantes.

Las propiedades del cloruro mercuríco (HgCl_2) vienen expresadas en la tabla 2:

<i>HgCl₂</i>	
<i>N°CAS</i>	10112-91-1
<i>Peso Molecular</i>	271.50 g/mol
<i>Densidad específica (20°C)</i>	5.53 g/cm ³
<i>Solubilidad en agua (20°C)</i>	74 g/L
<i>pH (50g/L,H₂O,20°C)</i>	3
<i>Punto de fusión</i>	276°C
<i>Punto ebullición</i>	302°C
<i>R28-34-48/24/25</i>	Corrosivo, tóxico; riesgo de efectos graves para la salud en caso de exposición prolongada por contacto con la piel e ingestión.
<i>DL₅₀ oral rata</i>	1 mg/kg
<i>DL₅₀ oral hombre</i>	29 mg/kg

Tabla 2. Propiedades del HgCl_2 .

Se preparan disoluciones de cada compuesto a la concentración de 10^{-2}M . Las disoluciones se esterilizan por filtración, con filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) y se diluyen con agua destilada estéril, para obtener una concentración final en los pocillos de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M de cadmio y 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M de mercurio.

Los pocillos controles y los tratados se completan con medio de cultivo hasta conseguir un volumen final de 1 mL.

IV.1.1.5. Exposición a campos magnéticos de 50 Hz.

Una de las dos placas de 12 pocillos se introduce en el solenoide, elaborado en el Departamento de Física Aplicada III señalado anteriormente. El solenoide se sitúa dentro de una estufa y la placa control se mantiene fuera del solenoide a un lado de la cavidad de la estufa (37°C) ya que el campo magnético está muy confinado en el volumen del arrollamiento (Figura 6). Se aplica un campo magnético de 32 G (0,5 A) utilizando el circuito mostrado en la Figura 1.

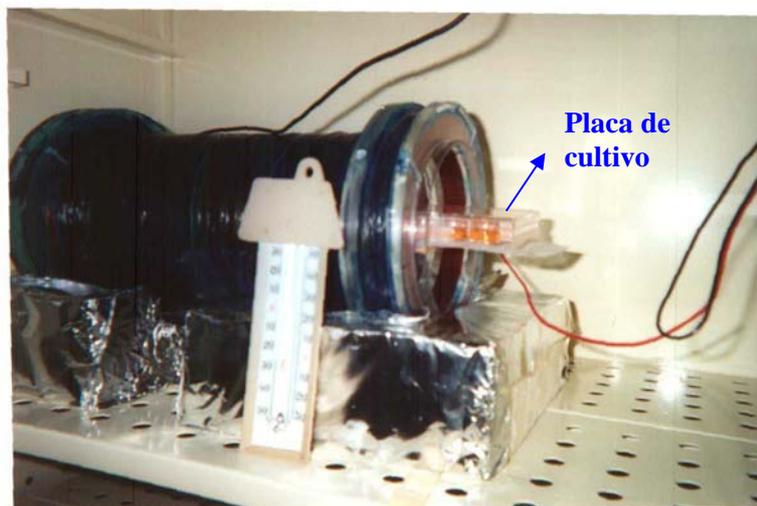


Figura 6. Placa de 12 pocillos que se introduce dentro la cámara de campos magnéticos.

IV.1.1.6. Identificación de daño genético mediante el ensayo de micronúcleos.

El principal objetivo de este experimento es determinar si la exposición de linfocitos a campos magnéticos de 50 Hz y distintas intensidades puede causar daño en el DNA en términos de inducción de micronúcleos. Los micronúcleos son cuerpos redondos derivados de fragmentos cromosómicos o de cromosomas enteros cuyos centrómeros han perdido su afinidad por el huso mitótico y al ser excluidos del núcleo celular en división representan una expresión del daño cromosómico provocado por un agente externo (Fenech y col. 1985).

Los micronúcleos requieren una sola división celular para ser expresados, por tanto para poder observarlos se debe bloquear la primera etapa de la mitosis, es decir la citoquinesis. Esto se consigue añadiendo citocalasina-B (Merck) a las 72 horas de la incubación. La citocalasina es una toxina fúngica, permeable a las células que inhibe la división celular bloqueando la formación de los microfilamentos contráctiles e inhibe el transporte de glucosa. Se prepara una disolución de citocalasina-B (10 mg en 2 ml dimetilsulfóxido). Se diluye esta disolución 1 en 9ml con el medio de cultivo. Se añade a cada pocillo de forma que su concentración final sea de 3 µg/ml. Se mantiene la incubación hasta una exposición de 96 horas en la

cámara de campos magnéticos, al término de las cuales se suprime el campo magnético y se procesan las placas.

Se coloca un volumen de 100 µl de cada pocillo de las placas de 12 pocillos en el cono del sistema de centrifugación sobre filtro y portaobjetos de la centrífuga cytospin 2 (Shandon) en la que se somete a 400 rpm durante 8 min.

La extensión se deja secar totalmente y se somete a la tinción rápida para hematología de Grifols, preparada para estos fines, con tres baños, fijador, colorante ácido y colorante básico. (Tabla 3).

<i>Tinción Rápida de Grifols</i> <i>Reactivos</i>	
Fijador	Solución alcohólica
Colorante 1	Solución ácida
Colorante 2	Solución básica

Tabla 3. Reactivos utilizados para la tinción celular.

Se sumerge el portaobjetos en las tres disoluciones, por el siguiente orden: solución fijadora durante 5", colorante ácido durante 5", colorante básico durante 5" y posterior lavado del portaobjetos con agua destilada. Se deja secar la extensión y se examina con objetivo de inmersión.

Después se cuentan los micronúcleos solamente en células que han sufrido bloqueo en la citoquinesis. Éstas son fácilmente reconocibles por su apariencia binucleada, además deben tener el citoplasma bien preservado.

Para el conteo de micronúcleos se utiliza el microscopio Leitz Dialux 20 EB con objetivo de inmersión. Se cuentan los micronúcleos de 500 células binucleadas, para elaborar la tabla correspondiente. El criterio para la identificación de micronúcleos es su diámetro inferior al núcleo entre 1/16 y 1/3, de la misma naturaleza, no refractarios, independientes al núcleo mayor y sin puentes.

IV.1.1.7. Determinación de proliferación celular mediante el ensayo con MTT.

Esta técnica consiste en utilizar MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma) para determinar la proliferación celular (Mosmann 1983).

El MTT es un sustrato de una enzima mitocondrial de células vivas, de forma que cuando se incuban células vivas con el MTT éstas lo metabolizan formándose en el cultivo unos precipitados de azul de formazán, visibles a simple vista que posteriormente son cuantificados mediante lectura óptica.

Se realizan los ensayos de proliferación celular en placa microtiter de cultivo de 96 pocillos. En cada pocillo de las dos placas de doce pocillos,

control y tratada se coge un volumen de 100 μL y se añade a una placa de 96 pocillos. Se ponen pocillos triplicados para cada punto del experimento.

Se añade a cada pocillo 20 μL de la disolución de MTT a 2,5 mg/mL en PBS (color amarillo). Se incuba la placa con el MTT a 37°C 5% CO_2 durante 3 o 4 horas. Transcurrido este tiempo, aparecen los precipitados azules de formazán que se disuelven completamente añadiendo a cada pocillo 100 μL de isopropanol con 0,04N HCl y resuspendiéndolos enérgicamente con micropipeta multicanal. Se lee la densidad óptica (D.O.) en el lector de placas Titertek Multiskan MCC/340 (Cultec) a 540nm y 690nm. A mayor D.O. mayor proliferación.

IV.1.1.8. Análisis estadístico.

Este experimento se repite 20 veces en las mismas condiciones (0,5 A). También se realiza utilizando intensidades de campo magnético de 1 A y 1,5 A, repitiéndose en cada caso 20 veces.

Para el análisis estadístico de los resultados experimentales (frecuencia de micronúcleos y proliferación celular) se aplica el test paramétrico de ANOVA. En concreto se realiza un test de comparación múltiple Tukey-Kramer. Según este análisis, la significación estadística se establece en todos los casos en valores de $p < 0,05$.

IV.1.2. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) en sangre humana

IV.1.2.1. Obtención de sangre humana

Todas las muestras de sangre humana sometidas a exposición de campos magnéticos proceden de un donante voluntario totalmente controlado procedente del propio laboratorio de investigación. La sangre se extrae de la vena cubital derecha y se coloca en tubos estériles que contienen Heparina-Litio para evitar la coagulación y 2mL de gel PSTTM (necesario para obtener posteriormente el suero mediante centrifugación).

IV.1.2.2. Exposición a campos magnéticos de 50 Hz

Se introduce 1 ml de sangre en cada tubo, siendo en total 12 tubos. La mitad de ellos se colocan en una gradilla y se introducen en la cámara de campos magnéticos de muy baja frecuencia antes mencionada (50 Hz y 0,25 A); la otra mitad se colocan también en una gradilla, fuera de la cámara pero dentro de la incubadora; de modo que los dos grupos de tubos se mantienen incubados a 37 °C.

Para la obtención del suero en las muestras, se centrifuga a 3200 rpm, 7 min. Esta operación se realiza a las 0h, 6h, 12h, 24h y 48h de la exposición a campo magnético y utilizando cada vez dos muestras, una control y otra tratada.

IV.1.2.3. Determinación de parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo

Una vez obtenido el suero sanguíneo, se analizan los siguientes parámetros bioquímicos (Tabla 1) y enzimáticos (Tabla 2).

<i>Parámetros bioquímicos</i>
◆ Proteínas totales
◆ Glucosa
◆ Urea
◆ Calcio
◆ Fósforo
◆ Hierro

Tabla 1. Parámetros bioquímicos sanguíneos.

<i>Parámetros enzimáticos</i>
◆ Láctico deshidrogenasa
◆ Creatina fosfoquinasa
◆ Fosfatasa alcalina
◆ Glutámico oxalacético transaminasa
◆ Glutámico pirúvico transaminasa
◆ Gammaglutamil transpeptidasa

Tabla 2. Parámetros enzimáticos sanguíneos.

Los parámetros bioquímicos y enzimáticos se determinan en el Autoanalizador de Bioquímica MEGA de Mitsubishi. Este sistema trabaja con pequeñas concentraciones de reactivo, que después diluye con agua desionizada. Casi todas las técnicas que se utilizan para determinar parámetros bioquímicos y enzimáticos son bireactivas. En el autoanalizador hay dos cámaras frigoríficas en una se coloca el primer reactivo y en la otra cámara el segundo. Las ventajas de este sistema es que se pueden utilizar muchos controles, las lecturas de los parámetros se realizan a gran velocidad y si hay algún fallo en el sistema, éste avisa para que se hagan las oportunas correcciones. Diariamente se realiza una calibración por triplicado del proceso, y se utiliza un control externo cuyo valor es desconocido, y un patrón interno cuyo resultado es conocido.

El sistema consiste en hacer reaccionar los reactivos específicos para cada tipo de parámetro con el suero a analizar. Se produce en cada caso una reacción, generalmente colorimétrica, cuyo resultado se detecta en el autoanalizador, que manda los datos a un ordenador, obteniéndose así los valores de todos los parámetros pertenecientes a una misma muestra de suero.

A continuación se expone el fundamento de los métodos específicos utilizados para la detección de determinados parámetros bioquímicos y enzimáticos en el autoanalizador.

◆ Proteínas Totales

Método Biuret. Prueba colorimétrica para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba

Los iones cobre reaccionan con las proteínas en medio alcalino para formar un complejo púrpura. La absorbancia de este complejo es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra.

Composición del reactivo en la prueba.

Hidróxido de sodio, Tartrato de potasio y sodio, Sulfato de cobre y Yoduro de potasio.

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una concentración entre 3 y 12 g/dL.

Valores normales

Recién nacidos: 4,6-7 g/dL

Niños mayores de 3 años y adultos: 6,4-8,3 g/dL

◆ Hierro

Método TPTZ. Prueba colorimétrica para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba.

El Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} , el cual forma un complejo azul con TPTZ (2,4,6-Tri [2-piridil]-5-triazina) que presenta una absorción máxima a 290 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hierro en la muestra.

Composición del reactivo en la prueba

Tampón glicina (pH 1,7), ácido L-ascórbico, 2,4,6-Tri [2-piridil]-5-triazina. Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una concentración de hierro entre 10 y 1000 $\mu\text{g/dL}$.

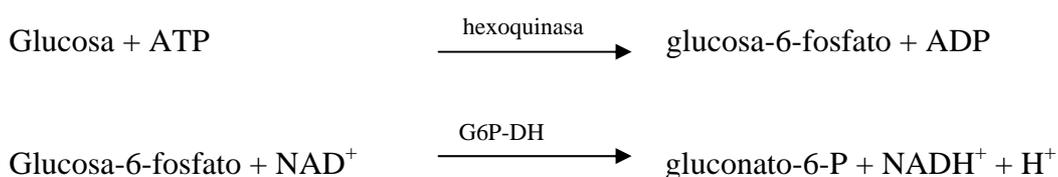
Valores normalesMujeres: 49-151 $\mu\text{g/dL}$ Hombres: 53-167 $\mu\text{g/dL}$

◆ Glucosa

Método Hexoquinasa. Prueba cinética por UV para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba

La glucosa es fosforilada en presencia de hexoquinasa y ATP. La glucosa 6-fosfato producida reacciona con NAD^+ en presencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) para formar gluconato-6-fosfato y NADH. El aumento en la absorbancia es proporcional a la concentración de glucosa.

Principio de la reacciónComposición del reactivo en la prueba

Tampón PIPES (pH 7,6), ATP, NAD^+ , Mg^{2+} , Hexoquinasa, G6P-DH.

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una concentración entre 10-800 mg/dL en suero y plasma.

Valores normales

Suero, plasma: 75-115 mg/dL.

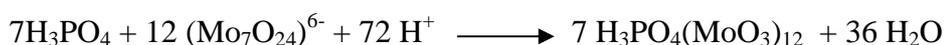
◆ Fósforo inorgánico

Prueba fotométrica por ultravioleta (UV) para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba

El fosfato reacciona con molibdato en medio fuertemente ácido para formar un complejo. La absorbancia de este complejo en el UV cercano es directamente proporcional a la concentración de fosfato.

Principio de la reacción



Composición del reactivo en la prueba

Ácido sulfúrico, heptamolibdato de amonio y glicina.

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una concentración entre 1 y 20 mg/dL en suero y plasma.

Valores normales

Niños: 3,6-5,9 mg/dL

Adultos: 2,6-4,5 mg/dL

◆ Calcio

Método Arsenazo III. Prueba colorimétrica para analizadores de química analítica (Olympus).

Principio de la prueba

Los iones de calcio reaccionan con arsenazo III en medio ácido para producir un complejo de color púrpura. La absorbancia de este complejo es proporcional a la concentración de calcio en la muestra.

Composición del reactivo en la prueba

Imidazol pH 6,0, Arsenazo III y Tritón X-100. En este caso todo el reactivo está contenido en un solo recipiente R1. El reactivo está listo para su uso y puede colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una concentración entre 4 y 18 mg/dL.

Valores normales

Suero, plasma: 8,1-10,4 mg/dL.

◆ Lactato deshidrogenasa (LDH)

Prueba cinética por UV para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba

Método basado en las recomendaciones de la “Federación Internacional de química clínica” y de la “Sociedad Alemana de química clínica” (IFCC 1994). Se mide el aumento de la absorbancia en UV al pasar de NAD^+ a NADH.

Principio de la reacción



Composición del reactivo en la prueba

Tampón D(-)N-metilglucamina, pH 9,4 (37°C, Lactato, NAD^+).

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una actividad de la enzima entre 25-1200 U/L.

Valores normales (37°C)

Adultos: 135-225 U/L

◆ γ -Glutamyltranspeptidasa (γ -GTP)

Prueba cinética colorimétrica para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la reacción



L-- γ -Glutamylglicilglicina + 5-amino-2-nitrobenzoato

Composición del reactivo en la prueba

Tampón Tris, pH 7,95 (37°C), glicilglicina, L- γ -Glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida.

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una actividad de enzima entre 3-1200 U/I.

Valores normales

Mujeres: 7-32 U/I.

Hombres: 10-49 U/I.

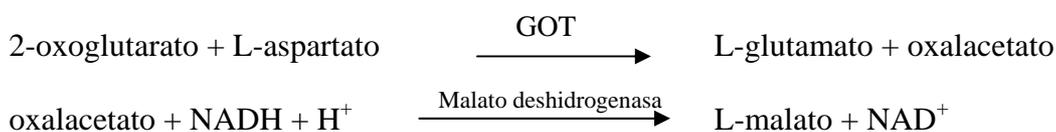
◆ Glutámico oxalacético transaminasa (GOT)

Prueba cinética por UV para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba

Método basado en las recomendaciones de la “Federación Internacional de química clínica” y de la “Sociedad Alemana de química clínica” (IFCC, 1994).

Se mide la absorbancia en UV de NADH y NAD^+ .

Principio de la reacciónComposición del reactivo en la prueba

Tampón Tris, pH 7,65 (37°C), L-aspartato, 2-oxoglutarato.

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una actividad de la enzima entre 3 y 1000 U/L.

Valores normales (37°C)

Mujeres: 10-31 U/L

Hombres: 10-37 U/L

◆ Creatina fosfoquinasa (CPK)

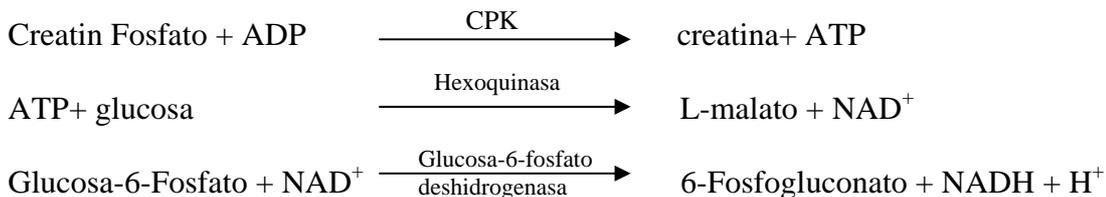
Prueba cinética por UV para analizadores de química clínica (Olympus).

Principio de la prueba

Método basado en las recomendaciones de la “Federación Internacional de química clínica” (IFCC, 1994) y el Comité Europeo para los Estándares clínicos y de laboratorio.

Se mide la absorbancia en UV de NAD^+ y NADH .

Principio de la reacción



Composición del reactivo en la prueba

Imidazol pH 6,5 (37°C), NADP, ADP, AMP, EDTA, glucosa, creatin fosfato, N-acetilcisteína, Mg^{2+} , diadenosina pentafosfato, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Los reactivos vienen comercializados en dos recipientes R1 y R2, ambos están listos para su uso y pueden colocarse directamente en el instrumento.

Linealidad

La prueba es lineal para una actividad de la enzima entre 10 y 2000 U/L.

Valores normales (37°C)

Mujeres: hasta 145 U/L

Hombres: hasta 170 U/L

IV.1.2.4. Análisis estadístico

Este experimento se realiza 5 veces en las mismas condiciones para cada intensidad de campo magnético estudiada (0,25 A, 0,5 A, 1 A) utilizando el mismo donante voluntario.

En el análisis estadístico de los resultados experimentales se aplica el test paramétrico de ANOVA. Para cada parámetro sanguíneo se realiza un test de comparación múltiple Tukey-Kramer.

Según este análisis, el nivel de significación estadística se define como $p < 0,05$.

IV.1.3. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratón.

El objetivo de este experimento es estudiar el efecto de los CM de 50 Hz sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) en ratones Balb/c de forma que se pueda tener más información sobre los efectos que provocan los CM de 50 Hz en el cerebro. La permeabilidad de la barrera hematoencefálica se evalúa por el paso del colorante vital rojo neutro (inyectado por vía intravenosa) al cerebro.

También se estudia el efecto sinérgico que pueda tener el metal pesado mercurio (neurotóxico) con los CM en la permeabilidad de la BHE.

IV.1.3.1. Sistema de generación de campos magnéticos de muy baja frecuencia 50 Hz y 27,5 G

La cámara de campos magnéticos está formada por dos solenoides de hilo de cobre colocados paralelamente entre los que se genera el campo magnético. La cámara ha sido proporcionada temporalmente por el Instituto de Magnetismo Aplicado, del CSIC y Rectorado de la Universidad Complutense de Madrid. Las dimensiones de la cámara son 39 cm de largo x

52 de ancho y cada solenoide tiene un diámetro de 43 cm. La cámara está conectada a un gausímetro, mediante el cual se puede variar manualmente la intensidad de campo magnético de 0 a 27,5 Gauss (Figura 1).



Figura 1. Cámara de campos magnéticos de 50 Hz.

La cámara está correctamente evaluada mediante dos gráficas, una de calibración y otra de intensidad de campo magnético.

En la figura 2 se observa la gráfica obtenida en la calibración del espacio interno de los dos solenoides en función de la distancia de separación entre ambos. Con ello se establece que el campo magnético se halla confinado en el interior de la estructura geométrica del solenoide.

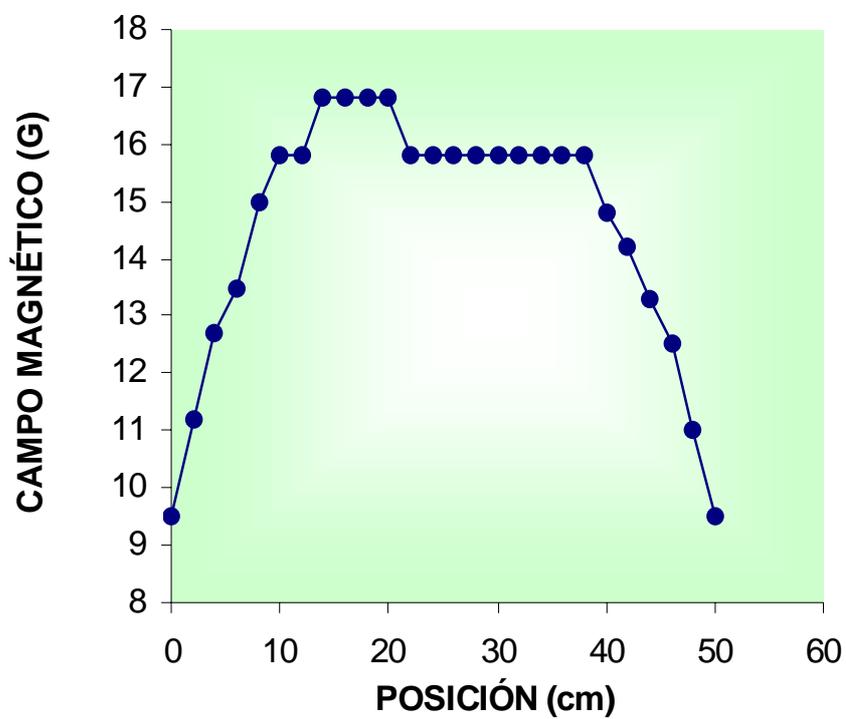


Figura 2. Calibración de la cámara de campos magnéticos.

En la figura 3 se observa la evolución de la intensidad del campo magnético en Gauss con la intensidad de la corriente en amperios.

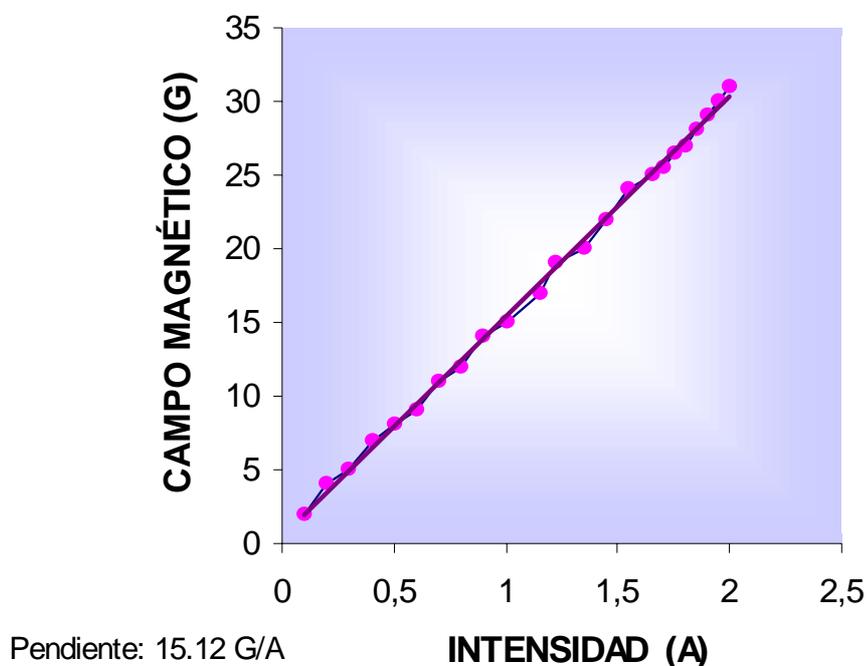


Figura 3. Distribución de la intensidad de corriente en la cámara de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz).

IV.1.3.2. Animales. Tratamiento con mercurio

Se utilizan ratones hembra Balb/c, jóvenes de 20g mantenidos en cajas metabólicas, cumpliendo todos los requisitos expresados en las normativas del R.D. 223/1988 del 14 de Marzo y de la Orden de 13 de Octubre de 1989 (BOE del 18 de octubre) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Se hacen dos grupos de 6 ratones, un grupo para su exposición a campos magnéticos y otro control, no expuestos. Los dos grupos fueron alimentados con dieta estándar y agua “ad libitum”, y mantenidos en jaulas metabólicas, con 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Tratamiento con mercurio

Los animales distribuidos en dos grupos (control y exposición a campos magnéticos) se someten al siguiente tratamiento (Tabla 1):

JAULA CONTROL	JAULA EXPUESTA A CAMPOS MAGNÉTICOS
<p style="text-align: center;">Blanco Control Control Control</p> <p style="text-align: center;">Tratamiento con Mercurio Tratamiento con Mercurio</p>	<p style="text-align: center;">Blanco Control Control Control</p> <p style="text-align: center;">Tratamiento con Mercurio Tratamiento con Mercurio</p>

Tabla 1. Tratamiento de los ratones con sobrecarga de mercurio.

En cada jaula hay seis ratones de los cuales tres son controles y dos se someten a un tratamiento con sobrecarga de mercurio durante 7 días. Al finalizar el experimento de exposición a campos magnéticos se inyecta a todos

los ratones, excepto a un control por jaula que denominamos blanco, una disolución del colorante vital rojo neutro por vía intravenosa.

El tratamiento con sobrecarga de mercurio se realiza durante los siete días que dura el experimento de exposición a campos magnéticos. Se administra HgCl_2 por vía intraperitoneal a la concentración de 0,01 mg Hg/kg/día, en agua destilada, a partir de una disolución madre de 1 mg/mL; mediante jeringuilla de insulina con divisiones de 0,01 mL.

IV.1.3.3. Exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G

La jaula con los animales para exposición se coloca geométricamente en el interior del cilindro que confina el campo magnético, mientras que la otra jaula, con los animales no expuestos se sitúa a 1 m de distancia, y en las mismas condiciones ambientales (Figura 4).

El campo magnético al que se someten los animales durante 7 días (168 horas) es de 27,5 G, y una frecuencia de 50 Hz.



Figura 4. Ratones expuestos a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G.

IV.1.3.4. Determinación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica mediante utilización de rojo neutro.

Tratamiento con rojo neutro

Al finalizar período de 7 días de exposición a los campos magnéticos, la jaula tratada se retira de la cámara de campos magnéticos. Los ratones de ambas jaulas control y expuesta se tratan con el colorante vital rojo neutro. Se utiliza una disolución de rojo neutro (Sigma), 5mg/mL en disolución salina fisiológica.

Se administra por vía intravenosa a través de la vena dorso-lateral de la cola 0,2 mL/ratón (1 mg rojo neutro) a todos los animales excepto a uno de cada jaula que denominamos blanco.

Determinación colorimétrica del rojo neutro

Treinta minutos después de la administración del rojo neutro, los animales se sacrifican mediante dislocación cervical. Se realiza la disección del cerebro, sin cerebelo ni médula oblongata.

Se someten los dos encéfalos a homogeneización con UltraTurrax (Janke&Kunkel) en disolución salina fisiológica 1+3 (p+v) en tubos de plástico pequeños (5 mL), y centrifugación en tubos Eppendorf de 1,5 mL a 13.500 rpm en Minifuge (Heraeus). Los sobrenadantes se filtran mediante filtros de 0,45 μ de diámetro. Antes de realizar la lectura espectrofotométrica de estos extractos debemos determinar la longitud de onda adecuada para la determinación colorimétrica del rojo neutro.

Con el objeto de saber cual es la longitud de onda apropiada para medir las muestras se registra el espectro ultravioleta y visible del rojo neutro determinándose así su pico máximo de absorción. Para ello se utiliza una disolución de rojo neutro (Sigma) en NaCl 0,8% a la concentración de 5 μ g/mL y se mide su absorbancia en el espectrofotómetro Uv-Visible Cary

300 BIO de Varian acoplado al programa de ordenador CarywinUV de Varian.

Una vez establecida la longitud de onda a la que se va a medir el rojo neutro (540 nm), procedemos a medir las muestras en el espectrofotómetro. De esta forma se cuantifica el pico correspondiente al rojo neutro que nos proporciona el valor del colorante ingresado en el cerebro. Se obtiene por tanto una medida de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en cada uno de los animales. Cuanto mayor sea el valor del rojo neutro a 540 nm, mayor será la cantidad de colorante ingresado en el cerebro, y por tanto será mayor la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

El extracto sobrenadante del cerebro control sin rojo neutro (blanco) y en ausencia de campo magnético se toma como cero para la lectura del pico del rojo neutro en el espectro visible (540 nm), de cada una de las muestras.

IV.1.3.5. Análisis estadístico

Este mismo experimento se repite 5 veces en las mismas condiciones. Para el análisis estadístico de los resultados experimentales se aplica el test paramétrico de ANOVA. Se realiza un test de comparación múltiple Tukey-Kramer. Según este análisis, el nivel de significación estadística se define como $p < 0,05$.

IV.2. APLICACIÓN DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RADIOFRECUENCIA (2,45 GHz).

IV.2.1. Campos electromagnéticos de radiofrecuencia (2,45 GHz) en ratas.

El objetivo de esta fase del trabajo consiste en determinar las propiedades eléctricas conductividad y permitividad de distintos tejidos de rata expuestos a campos electromagnéticos de radiofrecuencia, concretamente 2,45 GHz después de someter a los animales a una sobrecarga de metales pesados cadmio y mercurio por separado. Se ha elegido la frecuencia de 2,45 GHz ya es muy utilizada en numerosos procesos industriales, como por ejemplo, procesos de secado industrial, hornos microondas y máquinas de soldadura por arco.

La determinación de las propiedades eléctricas de tejidos se ha realizado a través de la colaboración entre nuestro grupo de trabajo y el Departamento de Física Aplicada III, perteneciente a la Facultad de Física, de la Universidad Complutense de Madrid.

Todo tejido vivo se caracteriza por su conductividad eléctrica (σ) y su permitividad dieléctrica (ϵ). Estas propiedades son responsables de la

interacción de los campos electromagnéticos con moléculas y estructuras biológicas. Los tejidos vivos están poco magnetizados, la componente eléctrica es primordial e induce a escala microscópica dos procesos: la oscilación y el desplazamiento de las cargas libres y la orientación de moléculas polares a la frecuencia de aplicación del campo electromagnético. Así valores elevados de la permitividad implican un efecto de apantallamiento considerable para el campo eléctrico, sin embargo el otro parámetro, la conductividad, origina la circulación de corrientes inducidas en los tejidos. La conductividad es el recíproco de la resistividad y se expresa en siemens por metro (S/m).

IV.2.1.1. Sistema experimental para la generación de campos electromagnéticos de radiofrecuencia a 2,45 GHz.

Célula de medida

Para la radiación y caracterización de muestras biológicas se ha utilizado el sistema diseñado y construido por el Departamento de Física Aplicada III perteneciente a la Facultad de Física de la Universidad Complutense de Madrid.

La célula de medida está formada por:

a) un contenedor de muestra formado por un bloque de metacrilato con una cavidad rectangular de 44mm de largo, 11mm de ancho y 2 mm de grosor. Dentro de esta cavidad rectangular es donde se va a introducir la muestra biológica. La permitividad compleja del bloque medida experimentalmente es $\epsilon_r = 2.6$ y la conductividad $4.96 \cdot 10^{-4}$ S/m. El bloque se divide en dos piezas para facilitar la colocación de la muestra biológica como muestra la Figura 1.

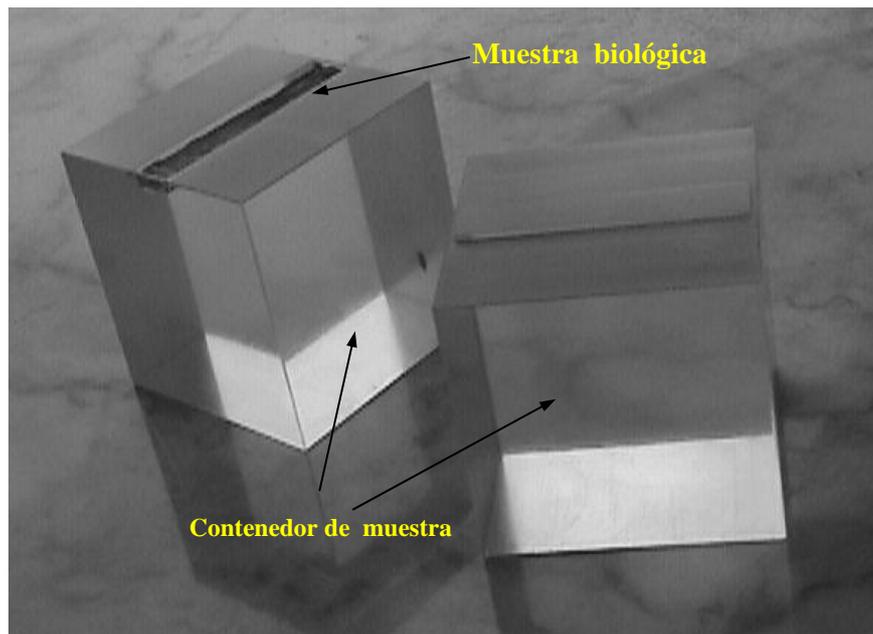


Figura 1. Contenedor de muestra.

b) una sección de guía de ondas WR 430 de aluminio altamente pulido de 34 cm de longitud total, pudiéndose variar su longitud mediante un

cortocircuito variable con objeto de fijar los planos de referencia adecuados. El bloque de metacrilato rellena completamente la sección de la guía de ondas WR430 útil para trabajar en el rango de 1,7 a 2,6 GHz. La figura 2 muestra la sección de guía de ondas con el contenedor de muestra.

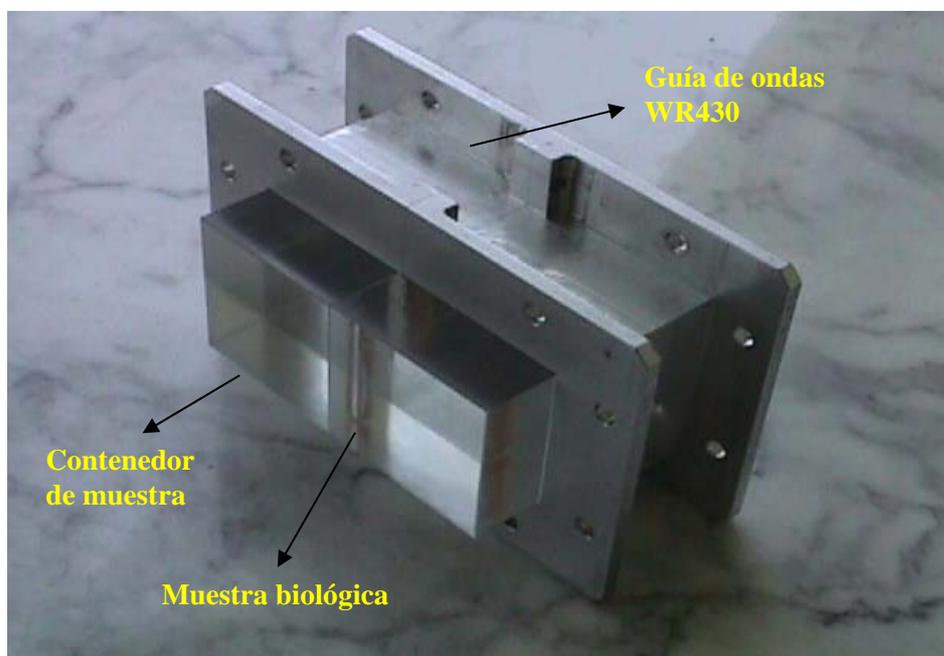


Figura 2. Sección de guía de ondas WR430 con el contenedor de muestra.

El sistema experimental para la radiación y caracterización de muestras consta también de un analizador vectorial Hewlett Packard 8720 y dos transiciones guía/coax de muy baja razón de onda estacionaria. Estas dos transiciones guía-coax se colocan en cada extremo de la sección de guía de

ondas WR430. Se usan cables coaxiales semirígidos para conectar cada transición al analizador de red.

La determinación experimental de las propiedades eléctricas (permitividad dieléctrica y conductividad) se realiza midiendo los coeficientes complejos de reflexión y transmisión de una muestra de tejido biológico utilizando el analizador vectorial. El experimento se realiza a la frecuencia industrial de 2,45 GHz.

A la frecuencia seleccionada para realizar el experimento, el tamaño de la muestra (11 mm) es muy pequeño comparado con la longitud de onda de la guía (148 mm) y se puede considerar que el campo eléctrico es prácticamente uniforme en toda la muestra colocada en el centro de la guía de ondas.

Calibración del sistema de medida

La calibración del sistema de medida, se realiza con la sección de guía de ondas WR430, se utilizan tres cargas standard de guía de ondas (corto, abierto y de banda ancha) junto con los sistemas de corrección de error internos del analizador vectorial. Para la calibración del sistema, en el contenedor de muestra, se sustituye la muestra de tejido biológico por una pieza de metacrilato de las mismas dimensiones.

La calibración nos permite obtener exactamente los coeficientes de reflexión y transmisión del bloque relleno con la muestra originados por las ondas incidentes y reflejadas, y que son medidos en el analizador vectorial en ambos planos de referencia.

IV.2.1.2. Animales

Se utilizan para este experimento 15 ratas macho Wistar, con una media de pesos entre 170 - 220g mantenidas en cajas metabólicas, cumpliendo todos los requisitos expresados en las normativas del R.D. 223/1988 del 14 de Marzo y de la Orden del 13 de Octubre (BOE del 18 de Octubre) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los animales son mantenidos en jaulas metabólicas en estabulario y alimentados con pienso estándar y agua “ad libitum”. Se distribuyen en tres grupos, permaneciendo todos en las mismas condiciones de temperatura (18°C), humedad y duración del ciclo luz/oscuridad (12/24h). Uno de los grupos es el control, formado por 5 ratas sin ningún tratamiento químico. El segundo grupo está formado por 5 ratas que se someten a un tratamiento con CdCl_2 , el tercer grupo de 5 ratas se somete a un tratamiento con HgCl_2 .

IV. 2.1.3. Tratamiento con cadmio

Un grupo de 5 ratas se trata con una disolución estéril de CdCl_2 . La disolución se prepara a partir de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) que se disuelve en agua destilada para obtener una concentración final de 1mg/mL; esta disolución se filtra mediante filtros de 0,45 μ . Posteriormente la disolución se autoclava para esterilizarla.

A las ratas se las inyecta diariamente por vía intraperitoneal una dosis que oscila entre 0,1 y 2,5 mg Cd/Kg peso corporal, durante 12 días, utilizando una jeringuilla de insulina estéril de único uso.

En la figura 3 se representan las dosis diarias de cadmio durante el tratamiento y en la figura 4 se observa la evolución del peso de las ratas con el tratamiento de cadmio.

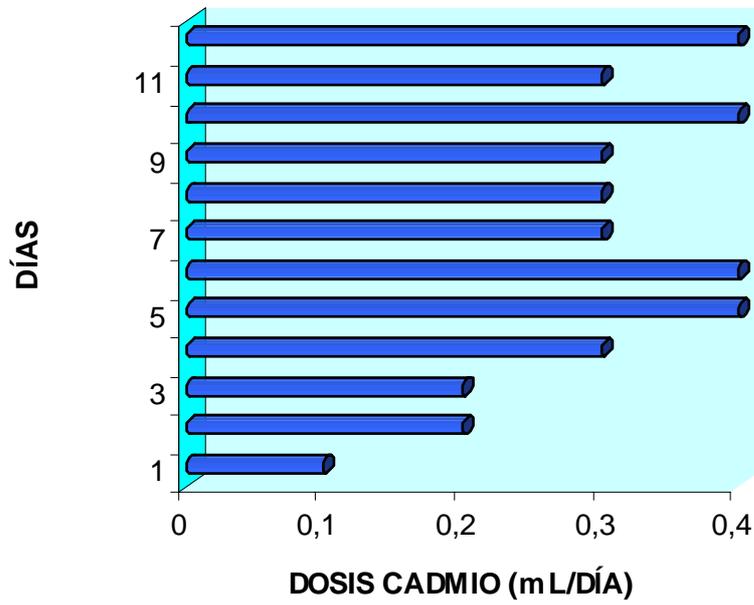


Figura 3. Dosis de cadmio en mL/día.

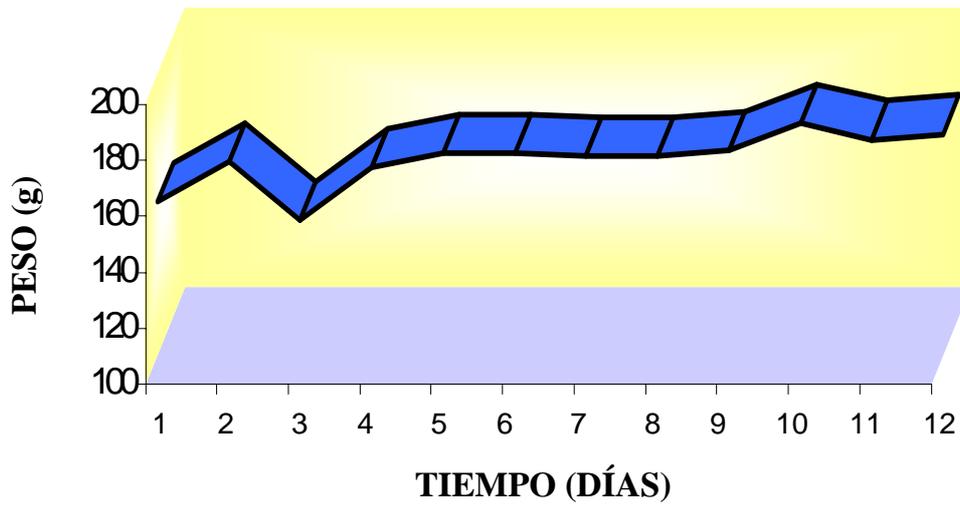


Figura 4. Evolución del peso de las ratas en función del tratamiento con cadmio.

Con el tratamiento de cadmio, se pretende que los animales tengan una sobrecarga de ión metálico, pero manteniendo el peso constante. La dosis se va aumentando diariamente pero si al inyectar una determinada dosis se observa que disminuye de peso, entonces se rebaja para que el animal mediante su regulación homeostática sea capaz de adaptarse a esta nueva situación. Todos los animales evolucionan de manera similar al tratamiento con cadmio, aunque cada rata tiene su propio metabolismo.

A continuación se describe la evolución del peso de las ratas control durante los 12 días que dura el experimento.

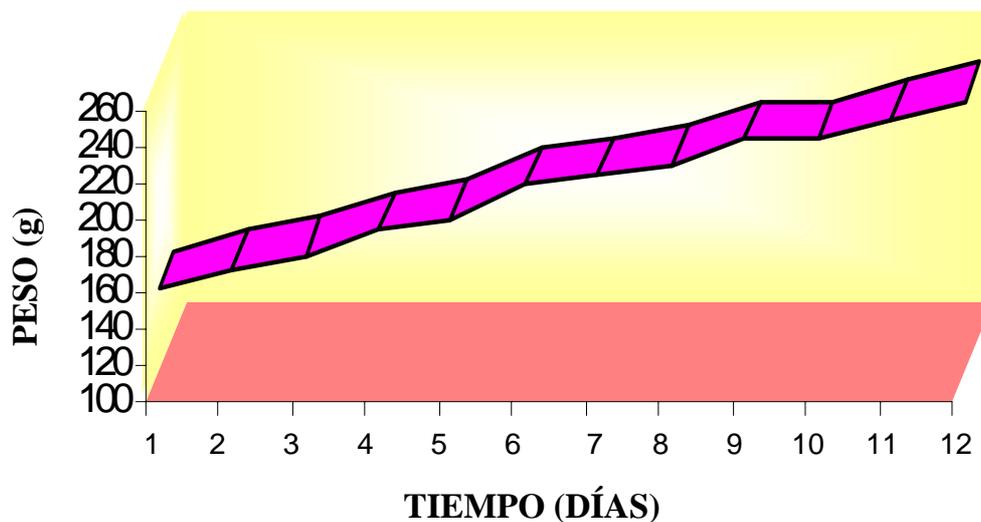


Figura 5. Evolución del peso de las ratas control.

En la figura 5 se observa un incremento diario del peso de las ratas control, este resultado es el que cabía esperar, ya que este grupo de animales no está sometido a ningún tratamiento químico, por tanto no existe ningún factor externo que pueda influir negativamente en su metabolismo.

IV.2.1.4. Tratamiento con mercurio.

Un grupo de 5 ratas se trata con una disolución estéril de HgCl_2 . La disolución se prepara a partir de HgCl_2 (Merck) que se disuelve en agua destilada para obtener una concentración final de 1mg/mL; esta disolución se filtra mediante filtros de 0,45 μ . Posteriormente la disolución se autoclava para esterilizarla.

Al grupo de individuos se les inyecta diariamente por vía intraperitoneal una dosis que oscila entre 0,1 y 2,5 mg Hg/Kg peso corporal, durante 12 días, utilizando una jeringuilla de insulina estéril de único uso.

En la figura 5 se representan las dosis diarias de mercurio durante el tratamiento y en la figura 6 se observa la evolución del peso de las ratas con el tratamiento de mercurio.

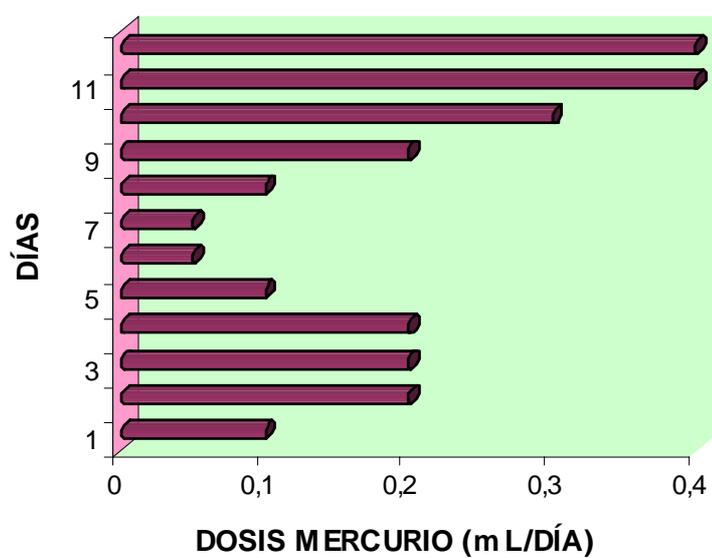


Figura 5. Dosis de mercurio en mL/día.

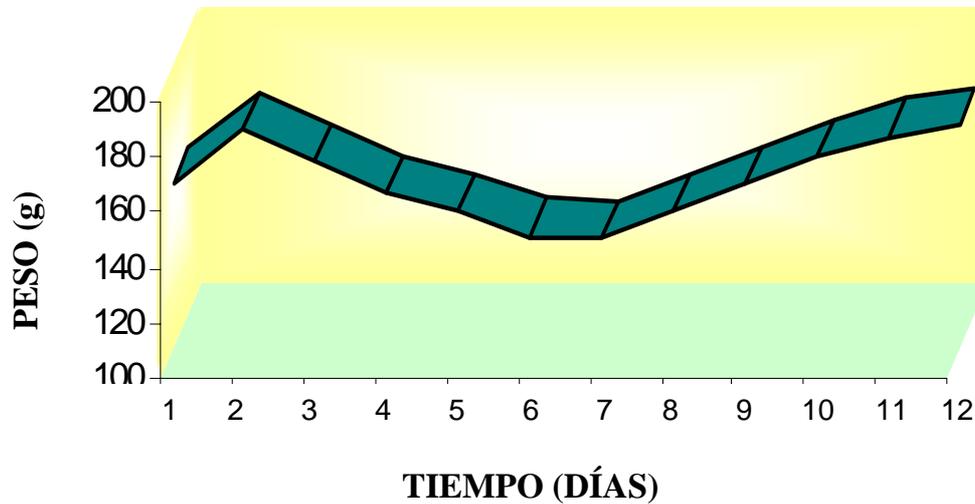


Figura 6. Evolución del peso de las ratas en función del tratamiento con mercurio.

En el tratamiento con sobrecarga de mercurio se pretende que los animales acumulen iones mercurio en su organismo, para ello se les administra diariamente una dosis cada vez mayor. Esta dosis se administra también en función de cómo va evolucionando el peso. Es decir, si se observa que el peso disminuye entonces se rebaja la dosis, para que el animal pueda restablecer su equilibrio homeostático.

IV.2.1.5. Análisis de sangre

Los animales son sacrificados mediante anestesia con éter, por extracción total de sangre mediante punción cardíaca. La sangre extraída a cada animal se distribuye en dos tubos de plástico uno de ellos con EDTA (Vacutainer), para realizar recuentos celulares, al que se añade un volumen de 2mL de sangre, y otro que contiene 2 mL de Gel PST™ y heparina-litio, al que se añaden 4 mL de sangre. Este tubo se centrifuga a 2500 rpm durante 7 min, y en el sobrenadante sérico se analizan los parámetros hematológicos, bioquímicos y enzimáticos. Las muestras de sangre y suero obtenidas de los animales control y tratados, se someten a los siguientes análisis hematológicos (Tabla 1), bioquímicos (Tabla 2) y enzimáticos (Tabla 3):

<i>Parámetros hematológicos</i>
◆ Eritrocitos
◆ Plaquetas
◆ Hemoglobina
◆ Hematocrito

Tabla 1. Parámetros hematológicos sanguíneos.

<i>Parámetros bioquímicos</i>
◆ Proteínas totales
◆ Glucosa
◆ Urea
◆ Albúmina
◆ Bilirrubina Total
◆ Calcio
◆ Fósforo
◆ Hierro
◆ Magnesio

Tabla 2. Parámetros bioquímicos sanguíneos.

<i>Parámetros enzimáticos</i>
◆ Láctico deshidrogenasa
◆ Creatina fosfoquinasa
◆ Glutámico oxalacético transaminasa
◆ Glutámico pirúvico transaminasa
◆ Gammaglutamil transpeptidasa

Tabla 3. Parámetros enzimáticos sanguíneos.

Los parámetros hematológicos se miden en el analizador Coulter Max H. En cada análisis, mediante un sistema de aspiración se coge siempre la

misma cantidad de sangre que después se diluye con un líquido isotónico (isotón).

El Coulter consta de dos cámaras, la primera contiene un hemolizante que se utiliza para romper los hematíes, de esta forma se puede determinar la hemoglobina contenida en estas células mediante la reacción de la cianmetahemoglobina. También se realizan recuentos de leucocitos y plaquetas; distinguiendo diferentes poblaciones de leucocitos por su tamaño. La segunda cámara diferencia los hematíes de las demás células por el tamaño, y realiza el recuento de los mismos. También se mide el volumen corpuscular medio de hematíes, leyéndose directamente el tamaño de cada célula. El valor hematocrito sale derivado de los anteriores resultados.

Los parámetros bioquímicos y enzimáticos se determinan en el Autoanalizador de Bioquímica MEGA de Mitsubishi, utilizando el mismo procedimiento que el descrito en el apartado IV.1.2 .3. de esta memoria.

IV.2.1.6. Determinación de las propiedades eléctricas del tejido (permitividad y conductividad).

Después de la extracción de sangre y muerte de los animales bajo anestesia se realiza la necropsia y se diseccionan los siguientes tejidos (Tabla 4):

DISECCIÓN DE TEJIDOS
<ul style="list-style-type: none">* Hígado* Riñones* Pulmones* Páncreas* Músculo (zona femoral)

Tabla 4. Órganos de rata diseccionados.

Se realizan cortes de cada tejido de 2mm de grosor y se colocan en placas Petri mantenidas a 0°-4°. Las muestras son trasladadas al Departamento de Física Aplicada III (Facultad de Física, UCM) donde se realizan las mediciones de la permitividad y conductividad eléctrica.

Con la ayuda de unas pinzas, los cortes de cada tejido se introducen en la cavidad rectangular del contenedor de muestra rellenando todo el espacio, sin que quede ningún hueco. Después se introduce el contenedor de muestra con la muestra de tejido en la guía de ondas WR430.

A cada muestra de tejido biológico se le va a aplicar un campo electromagnético de frecuencia 2,45 GHz, de esta forma se van a poder obtener datos sobre propiedades eléctricas de los tejidos, mediante las medidas de los coeficientes de reflexión y transmisión de la muestra de tejido biológico utilizando el analizador vectorial HP 8720.

Para realizar un análisis en 3-D de la distribución de los campos electromagnéticos dentro de la sección de guía de ondas WR430 conteniendo la muestra de tejido biológico se ha utilizado el simulador (HP-HFSS) HP High Frequency Structure Simulator 5.0, de Hewlett Packard.

Con el simulador se determina el valor de la permitividad dieléctrica compleja de un tejido que produciría los mismos valores de los coeficientes complejos de reflexión y transmisión que han sido determinados experimentalmente.

Para cada tejido biológico simulado se obtienen cuatro parámetros, dos módulos y dos fases. Los valores correctos son aquellos que se corresponden con los experimentales en los mismos planos de referencia.

Para cada tejido biológico obtenemos dos datos: la permitividad relativa dieléctrica y la conductividad como las partes real e imaginaria de la permitividad compleja.

IV.2.1.7. Análisis de la concentración de metal en cada tejido mediante ICP-MS

Se determina la cantidad de metal en cada tejido mediante la técnica de plasma de acoplamiento inductivo asociado a un espectrómetro de masas conocida comúnmente como ICP-MS (Induced coupled plasma-mass spectrometry), que se ha podido realizar gracias a la “ayuda de formación” del

Instituto de Salud Carlos III, en el Oekologisches Institut del GSF-Forschungszentrum de Neuherberg, Alemania, durante un mes.

El plasma de acoplamiento inductivo se consigue sometiendo un flujo de un gas, llamado gas plasmógeno, a la acción de un campo magnético, oscilante, inducido por una corriente de alta frecuencia.

Aparecen abundantes iones y electrones acelerados por efecto de la alternancia del campo magnético, se produce una liberación de energía por efecto Joule que permite alcanzar temperaturas de hasta 8000 K, así se consigue una geometría toroidal del plasma confinado en el campo magnético que se denomina “antorcha” por la alta radiación luminosa que produce. En este caso se utiliza argón como gas plasmógeno.

El plasma se confina en un sistema de tres tubos concéntricos abiertos por un extremo a la presión atmosférica. Por el tubo interior denominado “inyector”, se hace llegar la muestra, en forma de un aerosol procedente de un sistema nebulizador, al interior de la antorcha. A través de la cámara formada por los dos tubos exteriores, se transporta el argón mediante flujo turbulento, destinado a sustentar el plasma. Este flujo de argón sirve también para refrigerar las paredes del tubo exterior para evitar su fusión por las altas temperaturas alcanzadas por la antorcha.

En la zona de extracción se ponen en contacto la antorcha, que contienen los iones a analizar, y el espectrómetro de masas encargado de

analizarlos. El primer cono o de muestreo, posee un orificio central de 1mm, a través del cual fluyen los iones de la llama formando un aerosol. La parte central de este aerosol pasará por el orificio del segundo cono, o skimmer. Todo este proceso ocurre a gran velocidad por efecto del alto gradiente de vacío creado a través de las sucesivas cámaras. Los dos conos están mecanizados en una aleación especial del platino y montados sobre un soporte refrigerado por un circuito de agua.

A continuación de los dos conos de muestra se sitúa una óptica de extracción y enfoque iónico que mediante campos electromagnéticos adecuados, produce un haz de iones colimado. También se dispone de una barrera fotónica para evitar el ruido de fondo debido a fotones procedentes de la antorcha que pueden llegar al detector dispuesto, por igual razón fuera del eje óptico del espectrómetro. La eficacia de un sistema de extracción y enfoque, depende de su capacidad para conseguir a igualdad de concentración de muestra en la antorcha la máxima concentración iónica de analito en el haz iónico colimado que llega al analizador. El tipo de analizador que se utiliza en el espectrómetro de masas es el cuadrupolo simple.

En la figura 5 se observa un esquema general de un equipo de ICP-MS típico.

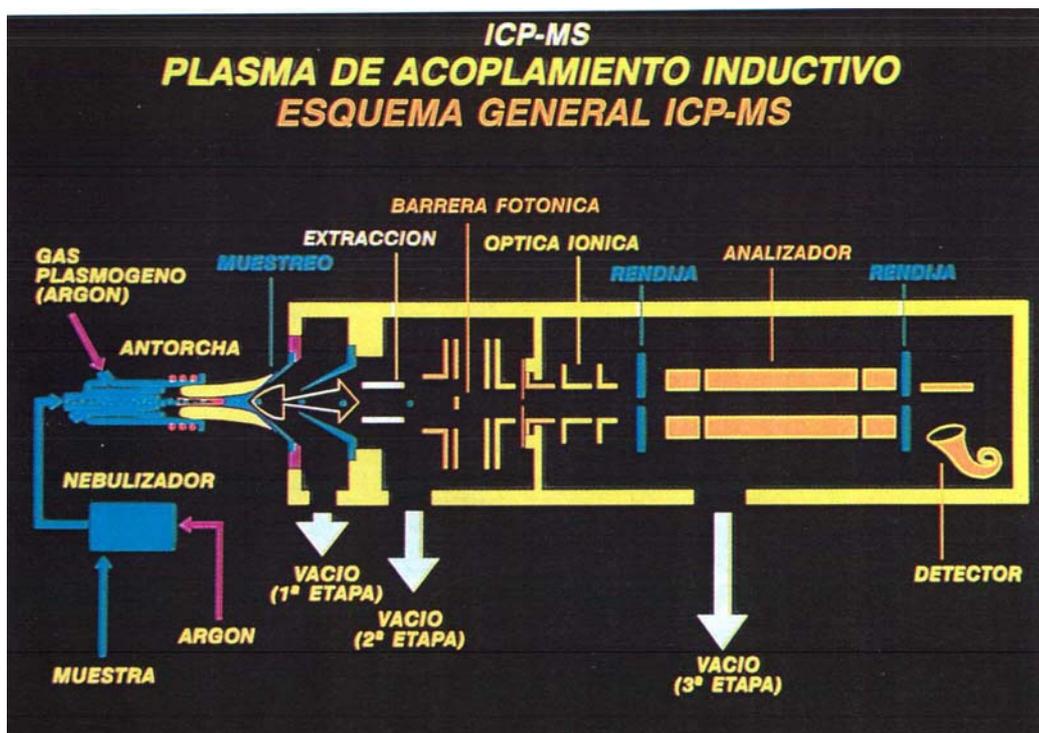


Figura 7. Esquema general de un sistema de plasma de acoplamiento inductivo asociado a un espectrómetro de masas.

Cada muestra de tejido es homogeneizada con tampón Tris-HCl 0,025 M pH 7,2 usando un UltraTurrax T-25 (Janke and Kunkel, Alemania). Las partículas sólidas se eliminan por centrifugación usando la centrífuga Heraeus Minifuge (Les Ulis, France). La extracción es seguida por ultracentrifugación usando una centrífuga Model HimaCS 120GX (Hitachi, Tokyo, Japan). Los metales del extracto se detectan mediante un ICP-MS Elan 6000 (Sciencetech, Concord, ON, Canada) equipado con un nebulizador micronconcéntrico (MicroMist), una cámara de nebulización (Glass Expansion, Romainmotier, Switzerland), y un set de conos de Pt-Rh. Se añade oxígeno al flujo de

nebulización. Las condiciones del ICP-MS se optimizan diariamente utilizando un procedimiento estándar.

Las condiciones de trabajo optimizadas del ICP-MS se representan en la tabla 5:

ICP-MS	
Instrumento	Elan 6000
Muestreador	Pt-Rh (10%) (1 mm orificio)
Skimmer	Pt-Rh (10%) (0.4 mm orificio)
Potencia de radiofrecuencia	1300 W
Flujo de gas plasmógeno	15 L/min
Flujo de gas auxiliar	1 L/min
Flujo de gas nebulizador	0.9 L/min
Flujo de oxígeno	20 mL/min
Isótopos monitorizados	Cd ¹¹⁴ , Hg ²⁰²
Temperatura de la cámara de spray	+2°C

Tabla 5. Condiciones de trabajo del ICP-MS.

Los datos se procesan utilizando el software Turbochrom (Perkin Elmer).

IV.2.1.8. Análisis estadístico

Este experimento se repite un total de 3 veces en las mismas condiciones. Para el análisis de los resultados experimentales se aplica un

análisis estadístico, el método utilizado es el test paramétrico de ANOVA. En cada tejido se realiza un test de comparación múltiple Tukey-Kramer, para las medidas de permitividad y conductividad y para la cantidad de metal en el tejido obtenida mediante ICP-MS.

Según estos análisis, diferencias extremadamente significativas con respecto al grupo control se consideran para $p < 0,001$, diferencias significativas corresponden a $p < 0,05$ y no significativas a $p > 0,05$.

V. RESULTADOS

V.1. CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz).

V.1.1. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) e intensidades 0,5 A, 1 A y 1,5 A en linfocitos humanos. Estudio del efecto simultáneo de los campos magnéticos y la presencia de iones cadmio y mercurio.

V.1.1.1. Ensayo de micronúcleos en linfocitos sometidos a campos magnéticos de 50 Hz a las intensidades de 0,5 A, 1 A y 1,5 A, en presencia de cadmio y de mercurio.

Las células elegidas para realizar este experimento son linfocitos porque son unos indicadores muy sensibles del daño cromosómico inducido tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se pretende determinar si la exposición de linfocitos a campos magnéticos (CM) de 50 Hz y diferentes intensidades (0,5 A, 1 A y 1,5 A) puede causar daño genético en términos de inducción de micronúcleos.

Además estos estudios se han realizado, siguiendo las recomendaciones del Parlamento Europeo (DOCE N° 205/440 documento N° A3-0238/94, 1994) en presencia de metales pesados, para determinar si estos agentes químicos potencian o no el efecto del campo electromagnético. Los metales pesados utilizados en el ensayo de micronúcleos son cadmio y mercurio, presentes en el medio ambiente debido a las actividades industriales.

Los micronúcleos son pequeños cuerpos redondos derivados de fragmentos cromosómicos o del cromosoma entero cuyos centrómeros han perdido su afinidad por el huso mitótico y representan una expresión del daño cromosómico.

El criterio para la identificación de micronúcleos es, su diámetro inferior al núcleo, de la misma naturaleza, no refractarios e independientes del mismo. Los micronúcleos necesitan una sola división celular para ser expresados, por tanto para poder observarlos se bloquea la citoquinesis utilizando citocalasina B a las 72 horas de incubación. Los micronúcleos se evalúan a las 96 horas. En el método de bloqueo de la citoquinesis los micronúcleos se cuentan sólo en células que tienen bloqueada la citoquinesis, estas células se encuentran en su primer ciclo de división y son fácilmente reconocibles por su apariencia binucleada.

Para realizar este ensayo se cuentan los micronúcleos existentes en 500 células binucleadas. Los resultados se van a expresar como la media de micronúcleos en 500 células binucleadas \pm desviación estándar.

En la Tabla 1 se expresa la media de micronúcleos /500 células binucleadas \pm DE a las intensidades de campo magnético 0,5 A, 1 A y 1,5 A en presencia de diferentes concentraciones de cadmio (Cd): de 10^{-4} M a 10^{-7} M.

En esta tabla no se representa la concentración de cadmio 10^{-3} M ya que a esta concentración el número de células en la preparación es muy pequeña, y no se observan linfocitos binucleados suficientes para llevar a cabo el experimento.

DOSIS CEM (A)	MEDIA MICRONÚCLEOS / 500 CELULAS BINUCLEADAS ± DE				
	Control	[Cd] 10 ⁻⁴ M	[Cd] 10 ⁻⁵ M	[Cd] 10 ⁻⁶ M	[Cd] 10 ⁻⁷ M
0	3,08±0,69	16,85±3,51	9,54±3,84	5,21±1,32	3,98±1,25
0,5	3,46±0,52	17,02±1,72	10,72±1,92	5,84±1,50	4,52±1,12
1	4,00±1,15	17,63±3,28	11,23±2,34	6,41±2,13	4,99±0,83
1,5	4,64±0,88	18,02±2,53	12,02±2,35	6,95±1,74	5,21±1,01

Tabla 1. Micronúcleos ± DE en 500 células binucleadas a las intensidades de campo magnético 0,5 A, 1 A y 1,5 A en presencia de cadmio.

Si comparamos los grupos tratados con cadmio, con el grupo control no tratado, se detecta un aumento del número de micronúcleos a medida que se incrementa la concentración de cadmio, siendo significativo ($p < 0,05$) para Cd 10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M y 10⁻⁶ M. A la concentración de Cd 10⁻⁷ M no se producen cambios significativos en el número de micronúcleos con respecto al control, sin cadmio. Estos resultados se producen en ausencia de CM, y también con campos magnéticos de intensidad 0,5 A, 1 A y 1,5 A.

Si tenemos en cuenta el grupo control, en ausencia de cadmio, se observa un pequeño aumento del número de micronúcleos a medida que va incrementándose la dosis de CM aplicado, sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo para ninguna de las intensidades de campo magnético estudiadas (0,5 A, 1 A, 1,5 A). El número de micronúcleos en el grupo control no se ve afectado por la exposición a campo magnético de 50 Hz a las intensidades de 0,5 A, 1 A y 1,5 A.

En los grupos tratados con cadmio a diferentes concentraciones, de 10^{-4} M a 10^{-7} M se detecta también en todos los casos un ligero aumento del número de micronúcleos a medida que aumentamos la dosis de campo magnético, pero este aumento no es significativo para ninguna intensidad de CM estudiada.

A continuación se representa la media de micronúcleos / 500 células binucleadas \pm DE a las intensidades de campo magnético 0,5 A, 1 A y 1,5 A en presencia de diferentes concentraciones de mercurio (Hg): de 10^{-4} M a 10^{-7} M.

DOSIS CM (A)	MEDIA MICRONÚCLEOS / 500 CELULAS BINUCLEADAS ± DE				
	Control	[Hg] 10 ⁻⁴ M	[Hg] 10 ⁻⁵ M	[Hg] 10 ⁻⁶ M	[Hg] 10 ⁻⁷ M
0	3,08±0,69	12,48±2,81	6,50±1,73	4,01±1,18	3,20±0,76
0,5	3,46±0,52	12,84±1,81	7,23±1,65	4,50±1,27	3,81±0,35
1	4,00±1,15	14,02±2,30	8,03±1,98	5,12±1,70	4,45±0,57
1,5	4,64±0,88	14,48±1,92	8,67±1,33	5,43±1,53	4,92±1,10

Tabla 2. Micronúcleos ± DE en 500 células binucleadas a las intensidades de campo magnético 0,5 A, 1 A y 1,5 A en presencia de mercurio.

Como sucede anteriormente con el cadmio, no se va a representar la concentración de mercurio 10⁻³ M ya que es una concentración muy tóxica para las células y no se observan linfocitos binucleados suficientes para llevar a cabo el ensayo.

Entre los grupos tratados con mercurio y el grupo control no tratado, se detecta un aumento del número de micronúcleos a medida que aumenta la concentración de mercurio, siendo significativo ($p < 0,05$) para Hg 10⁻⁴M y 10⁻⁵M. No se producen cambios significativos en el número de micronúcleos con respecto al control, sin mercurio, a las concentraciones de Hg 10⁻⁶ M y

10^{-7} M. Estos resultados se obtienen en ausencia de CM, y también con campos magnéticos de intensidad 0,5 A, 1 A y 1,5 A.

El grupo control, en ausencia de mercurio, es el mismo que el de la tabla 1, por tanto como se expuso anteriormente, el número de micronúcleos en el grupo control no se ve afectado por la exposición a campos magnéticos de 50 Hz a las intensidades de 0,5 A, 1 A y 1,5 A.

En los grupos tratados con mercurio se observa a todas las concentraciones de Hg 10^{-4} M a 10^{-7} M un ligero incremento del número de micronúcleos a medida que aumentamos la dosis de CM, pero este aumento no es significativo para ninguna de las intensidades de campo magnético estudiadas: 0,5 A, 1 A y 1,5 A.

Los resultados obtenidos indican que la exposición de linfocitos humanos de sangre periférica durante 96 horas a un campo magnético de 50 Hz y diferentes intensidades (0,5 A, 1 A y 1,5 A) no afecta al número de micronúcleos. No se han encontrado por tanto efectos genotóxicos después de la aplicación de campos magnéticos de 50 Hz e intensidades de 0,5 A, 1 A y 1,5 A.

Tampoco se observa efecto sinérgico entre los metales estudiados (cadmio y mercurio) y el campo magnético. En los grupos tratados con metal cuya concentración varía de 10^{-4} M - 10^{-7} M no se detectan cambios significativos en el número de micronúcleos a ninguna intensidad de CM estudiada.

Si nos centramos en el efecto solamente del metal, con el cadmio a concentraciones de 10^{-4} M a 10^{-6} M se observa efecto genotóxico, se produce un aumento significativo de número de micronúcleos con respecto al control, el cadmio ejerce una acción directa genotóxica, se intercala entre las hebras del DNA, inhibe la DNA polimerasa, provoca roturas en DNA. Además induce la formación de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno que pueden afectar al DNA. En el caso del mercurio, se detecta un aumento significativo del número de micronúcleos respecto al control a las concentraciones de 10^{-4} M, 10^{-5} M que puede ser debido a que el mercurio también induce la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden provocar lesión en el DNA. Para ambos metales la concentración de 10^{-3} M es muy tóxica y no se han observado linfocitos binucleados suficientes en la preparación para realizar el experimento.

A continuación se representan unas fotomicrografías que corresponden a una visión general de los linfocitos control en cultivo (Figura 1). En la figura 2 se observa un linfocito control binucleado y en la figura 3 un linfocito control binucleado con un micronúcleo.

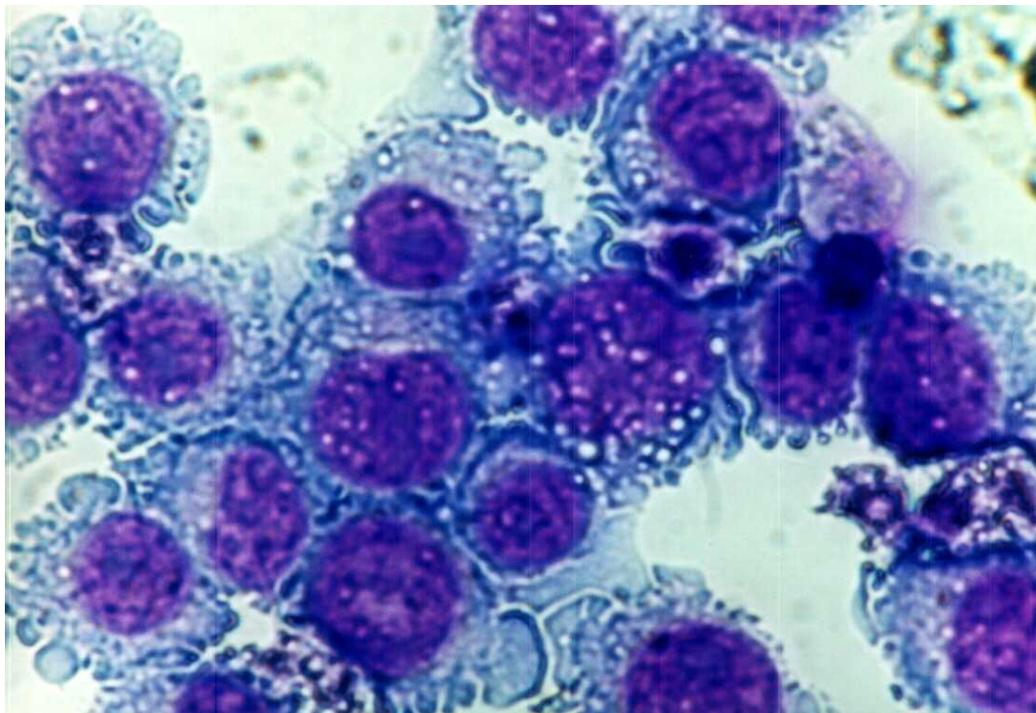


Figura 1. Fotomicrografía de linfocitos control en cultivo.



Figura 2. Fotomicrografía de linfocito control binucleado.



Figura 3. Fotomicrografía de linfocito control binucleado con un micronúcleo.

V.1.1.2. Determinación de proliferación celular en linfocitos sometidos a campos magnéticos de 50 Hz a diferentes intensidades 0,5 A, 1 A, 1,5 A en presencia de cadmio y de mercurio.

La detección de la proliferación celular se realiza mediante la técnica del MTT. Se mide la densidad óptica en un lector de placas a 540 nm y 690 nm. En los resultados se representa la densidad óptica $\times 10^3$; cuanto mayor es la densidad óptica, mayor es la proliferación celular. En todos los experimentos se utiliza un blanco que contiene medio de cultivo, sin células.

Primeramente se mide la proliferación celular de linfocitos control y expuestos a campos magnéticos (CM) de 50 Hz a diferentes intensidades de CM: 0,5, 1 y 1,5 A durante 96 horas (Figura 4). Después se estudiará el efecto combinado con los metales pesados cadmio y mercurio.

En la figura 4, se observa que al aplicar un campo magnético de 50 Hz e intensidad 0,5 A la proliferación celular es muy similar al control, no se producen cambios significativos. Con la intensidad de campo magnético de 1 A se detecta un ligero aumento de la proliferación celular con respecto al control, pero no es significativo. Sin embargo, con la intensidad de CM de 1,5 A, se produce una disminución significativa ($p < 0,05$) de la proliferación celular con respecto al control. Estos cambios en la proliferación se deben a

un aumento de temperatura $> 37^{\circ}\text{C}$ en los cultivos celulares expuestos a campos magnéticos con la intensidad de 1,5 A, mientras que los controles mantienen su temperatura constante.

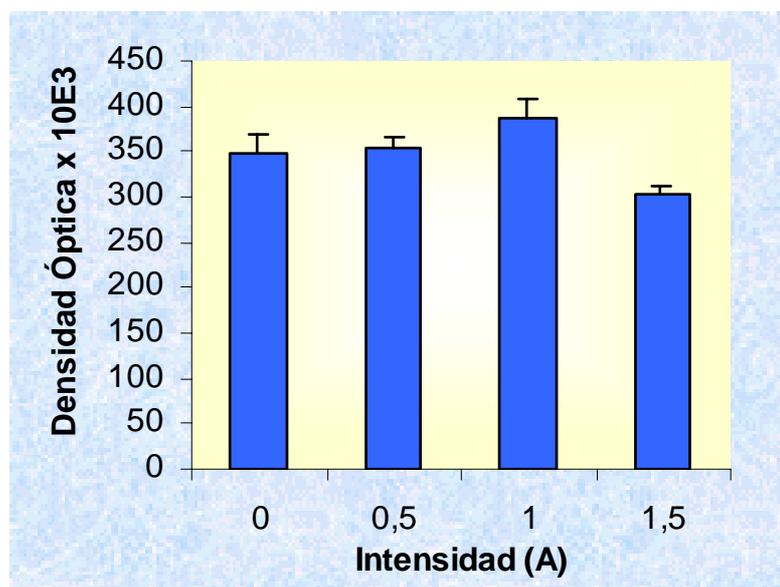


Figura 4. Proliferación celular de linfocitos humanos controles y expuestos a campo magnético de 50 Hz e intensidades de 0,5 A, 1 A y 1,5 A, durante 96 horas.

V.1.1.2.1. Campo magnético de 50 Hz y 0,5 A

Se determina la proliferación celular de linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 0,5 A a diferentes concentraciones de cadmio (Figura 5) y mercurio (Figura 6), durante 96 horas.

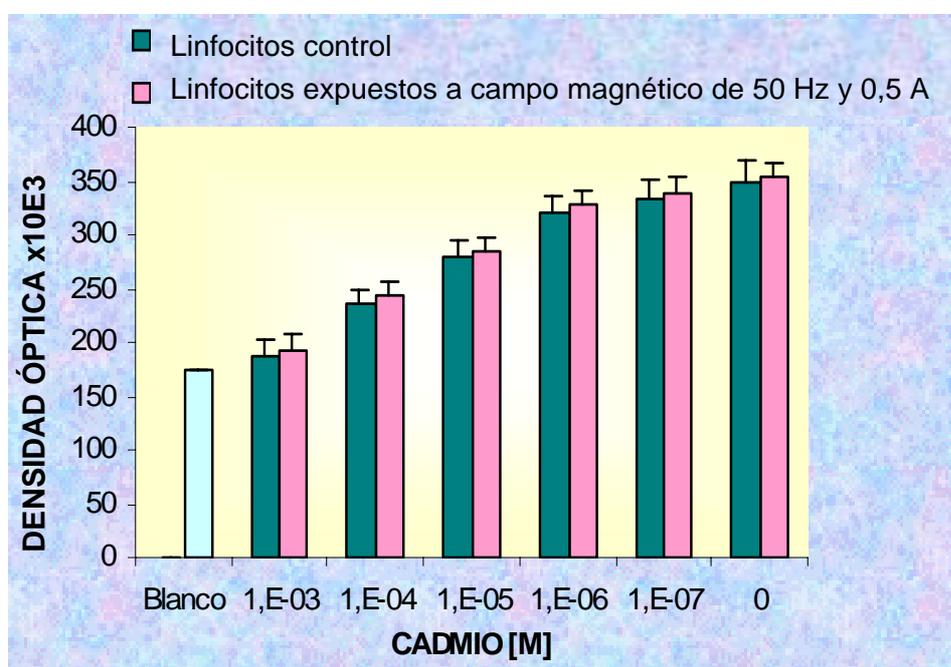


Figura 5. Proliferación celular de linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 0,5 A en presencia de diferentes concentraciones de cadmio, durante 96 h.

En la figura 5 se representa la densidad óptica $\times 10^3$ para los linfocitos control y los linfocitos expuestos a campo magnético de intensidad 0,5 A, ambos grupos en presencia de cadmio a las concentraciones de 10^{-3} M a

10^{-7} M. También se determina el blanco, correspondiente al medio de cultivo sin células.

Se observa tanto en el grupo control como en el grupo expuesto a CM de 0,5 A una disminución de la proliferación celular a medida que aumenta la concentración de cadmio, que es significativa ($p < 0,05$) para la concentración de Cd 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M.

La concentración de Cd 10^{-3} M es tóxica para las células, tanto para el grupo control, como para el grupo expuesto a campos magnéticos, a esta concentración se obtiene un valor de proliferación celular muy próximo al blanco.

Por otro lado, no se detectan cambios estadísticamente significativos entre el grupo control y el grupo expuesto a CM de 0,5 A, a ninguna de las concentraciones de cadmio utilizadas.

En la figura 6 se evalúa la densidad óptica $\times 10^3$ para los linfocitos control y los expuestos a campo magnético de intensidad 0,5 A, ambos grupos en presencia de mercurio a las concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-7} M. También se representa el blanco, correspondiente al medio de cultivo sin células.

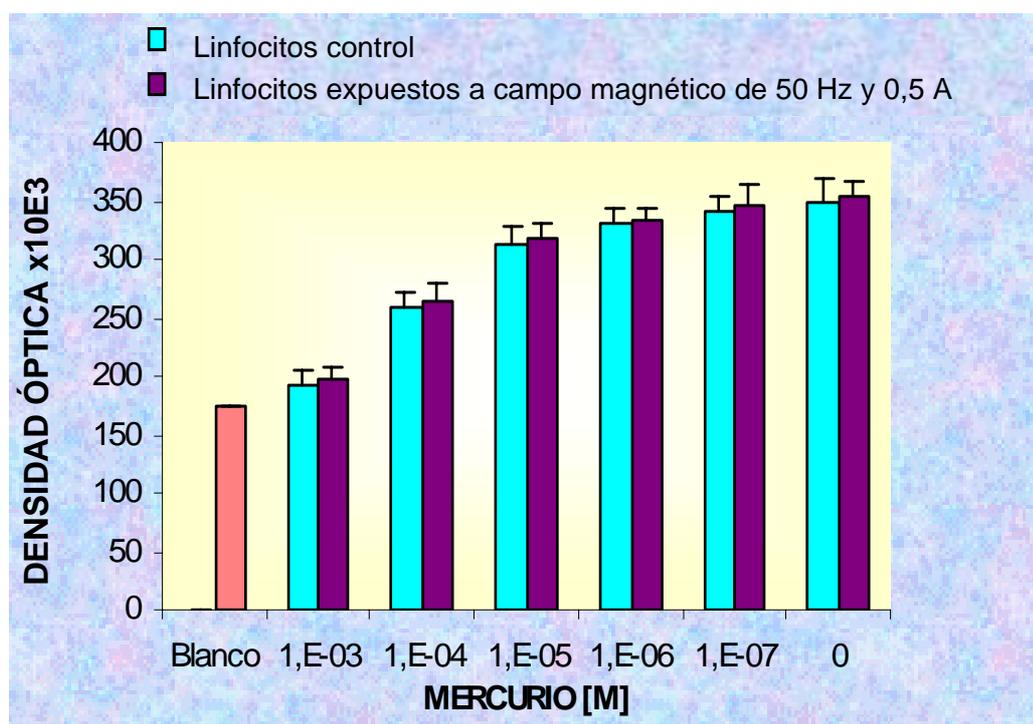


Figura 6. Proliferación celular de linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 0,5 A en presencia de diferentes concentraciones de mercurio, durante 96 h.

Al igual que en la figura 5, se produce una disminución significativa ($p < 0,05$) de la proliferación celular para la concentración de Hg 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M tanto en el grupo control como en el grupo expuesto a campos magnéticos de 0,5 A.

Del mismo modo que sucede con el cadmio, el valor más bajo de la proliferación celular se registra a la concentración de mercurio de 10^{-3} M

tanto para el grupo control, como para el grupo expuesto a campos magnéticos.

Entre el grupo control y el grupo expuesto a CM de intensidad 0,5 A, no se detectan cambios estadísticamente significativos a ninguna de las concentraciones de mercurio utilizadas.

V.1.1.2.2. Campo magnético de 50 Hz y 1 A

Se evalúa la proliferación celular de linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz e intensidad 1 A a diferentes concentraciones de cadmio (Figura 7) y mercurio (Figura 8), durante 96 horas.

En la figura 7 se determina la densidad óptica $\times 10^3$ para los linfocitos control y los expuestos a CM de intensidad 0,5 A, ambos grupos en presencia de cadmio a las concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-7} M. Se representa también el blanco.

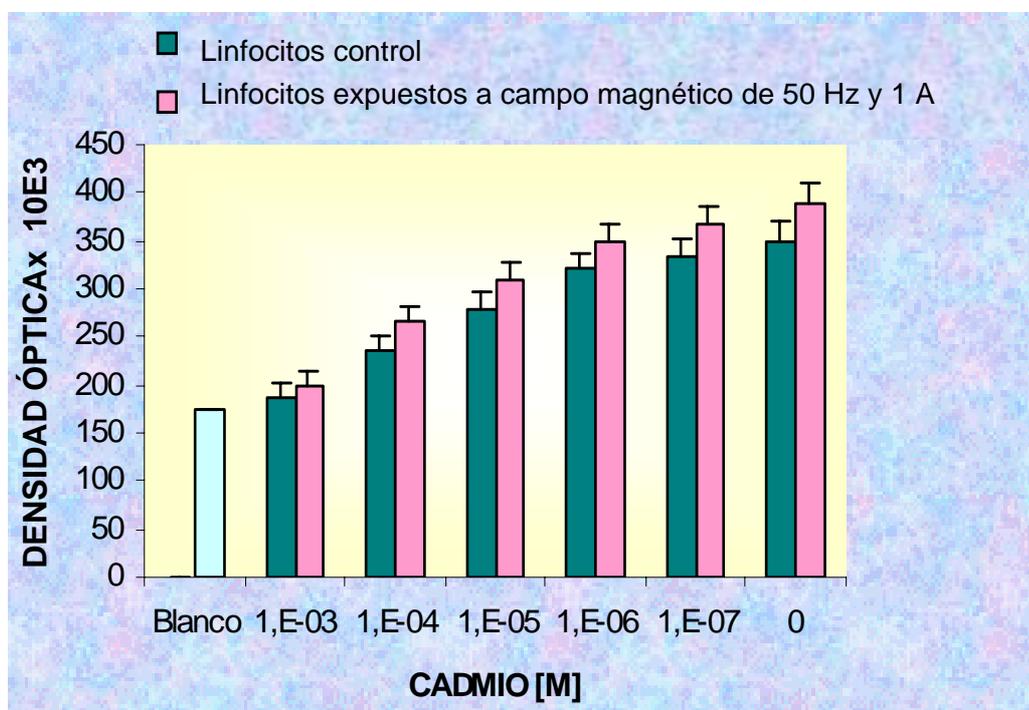


Figura 7. Proliferación celular en linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 1 A en presencia de diferentes concentraciones de cadmio, durante 96 h.

En los linfocitos control y en los expuestos a campos magnéticos de 1 A, se observa una disminución de la proliferación celular a medida que aumenta la concentración de cadmio, siendo significativa ($p < 0,05$) para las concentraciones de cadmio $\geq 10^{-5}$ M. A concentraciones menores de 10^{-5} M no se detectan cambios significativos con respecto a los linfocitos no tratados con metal.

Se produce un aumento de la proliferación celular en el grupo expuesto a campos magnéticos de 1 A con respecto al grupo control, no expuesto, a todas las concentraciones de cadmio, pero no es estadísticamente significativo. En la figura 8 se representa la densidad óptica $\times 10^3$ para los linfocitos control y los linfocitos expuestos al campo magnético aplicado de intensidad 1 A, ambos grupos en presencia de mercurio a las concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-7} M. También se representa el blanco, correspondiente al medio de cultivo sin células.

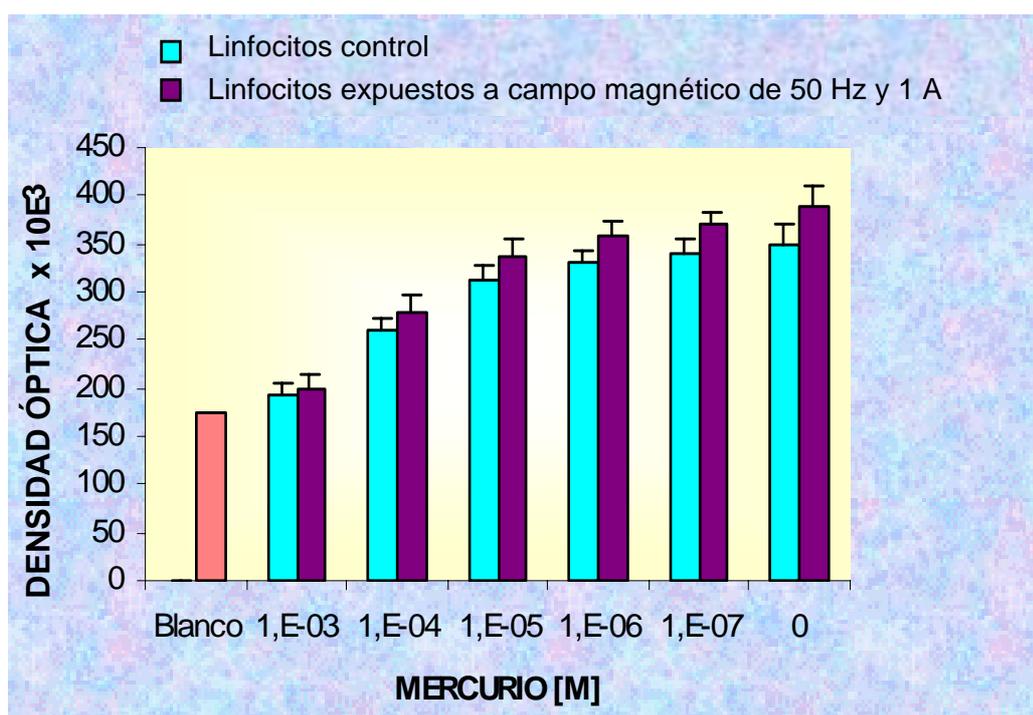


Figura 8. Proliferación celular en linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz, 1 A en presencia de diferentes concentraciones de mercurio, durante 96 h.

Igual que sucede en la figura 7 con el tratamiento con cadmio, se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) de la proliferación celular a las concentraciones de mercurio de 10^{-5} M, 10^{-4} M y 10^{-3} M tanto en el grupo control como en el grupo expuesto a campos magnéticos de 1 A. A la concentración de Hg 10^{-3} M se obtiene el valor mínimo de la proliferación celular siendo similar al blanco. No se detectan cambios significativos a concentraciones menores de 10^{-5} M con respecto a los linfocitos no tratados con metal.

También se produce un aumento de la proliferación celular en el grupo expuesto a campos magnéticos de 1 A con respecto al grupo control, no expuesto, a todas las concentraciones de cadmio, pero no es estadísticamente significativo.

V.1.1.2.3. Campo magnético de 50 Hz y 1,5 A

Se determina la proliferación celular de linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 1,5 A a diferentes concentraciones de cadmio (Figura 9) y mercurio (Figura 10), durante 96 h.

En la figura 9 se evalúa la densidad óptica $\times 10^3$ para los linfocitos control y los expuestos a CM de intensidad 1,5 A, ambos grupos en presencia

de cadmio a las concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-7} M. Se representa también el blanco, que corresponde al medio de cultivo sin células.

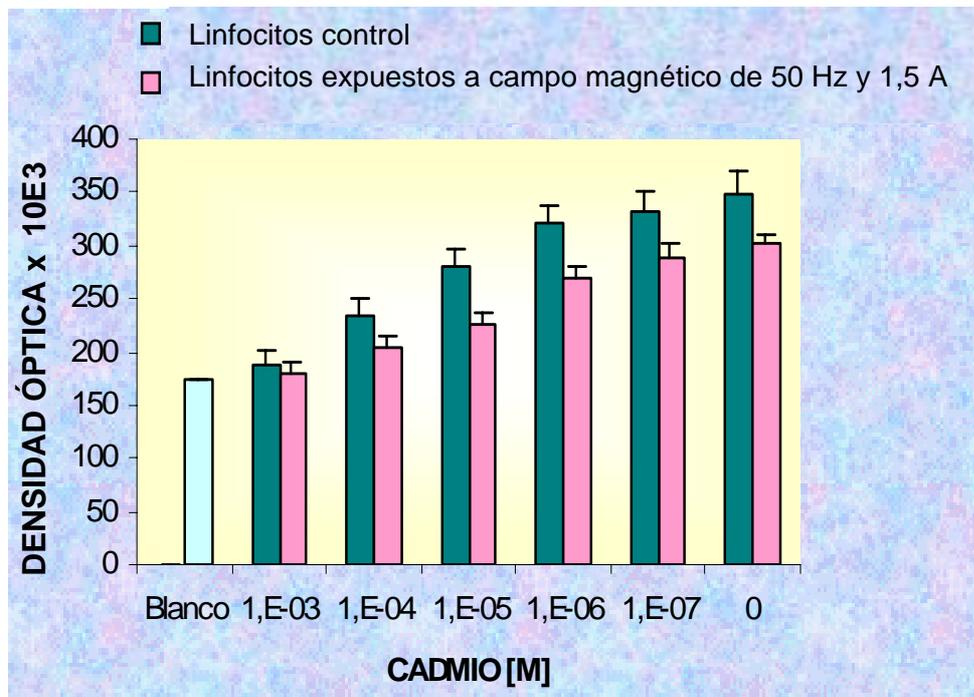


Figura 9. Proliferación celular en linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 1,5 A en presencia de diferentes concentraciones de cadmio, durante 96 h.

En la figura 9 se detecta tanto en el grupo control como en el expuesto a campos magnéticos de 1,5 A una disminución de la proliferación celular a medida que se incrementa la concentración de cadmio, siendo significativa ($p < 0,05$) para las concentraciones de cadmio $\geq 10^{-5}$ M.

Entre los linfocitos control y los linfocitos expuestos a campos magnéticos de 1,5 A, se produce una disminución significativa ($p < 0,05$) de la

proliferación celular para las concentraciones de cadmio $\geq 10^{-4}$ M. Este cambio significativo en la proliferación celular se debe a que en el experimento con CM de 1,5 A se eleva mucho la temperatura de incubación, sin embargo en los controles se mantiene constante; por tanto la disminución de la proliferación se debe sólo al efecto de la temperatura.

La concentración de 10^{-3} M de cadmio es muy tóxica para las células, a esta concentración no se detecta ningún cambio significativo en la proliferación celular entre el grupo control y el grupo expuesto a campos magnéticos siendo los valores de la densidad óptica muy similar al blanco tanto para el grupo control como para el grupo expuesto a campos magnéticos.

En la figura 10 se representa la densidad óptica $\times 10^3$ para los linfocitos control y los expuestos a campo magnético de intensidad 1,5 A, ambos grupos en presencia de mercurio a las concentraciones de 10^{-3} M a 10^{-7} M durante 96 h. Se representa también el blanco, que corresponde al medio de cultivo sin células.

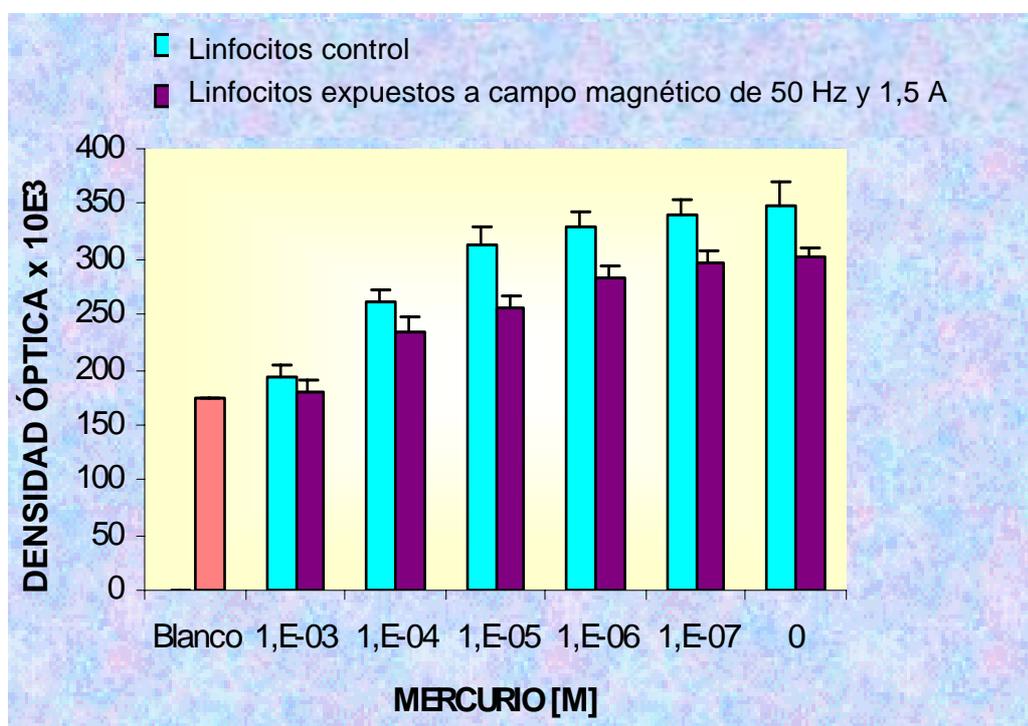


Figura 10. Proliferación celular en linfocitos control y expuestos a campo magnético de 50 Hz y 1,5 A, en presencia de diferentes concentraciones de mercurio, durante 96 h.

Al igual que en la figura 9 para el cadmio, en la figura 10 se observa tanto en el grupo control como en el expuesto a campos magnéticos de 1,5 A una disminución de la proliferación celular a medida que se incrementa la concentración de mercurio, siendo significativa ($p < 0,05$) para las concentraciones de mercurio de 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M.

A concentraciones menores de 10^{-5} M no se observan cambios significativos con respecto a los linfocitos no tratados con metal.

Se detecta una disminución significativa ($p < 0,05$) de la proliferación celular entre el grupo control y el expuesto a CM de 1,5 A, para las concentraciones de mercurio de 10^{-4} a 10^{-7} M que es debida igual que en el caso anterior al efecto de la temperatura.

La concentración de 10^{-3} M de mercurio es muy tóxica para las células por lo que no se observan cambios significativos en la proliferación celular entre el grupo control y el grupo expuesto a CM de 1,5 A.

V.1.1.2.4. Balance global de los resultados obtenidos.

En estos experimentos se han utilizado campos magnéticos de 50 Hz a varias intensidades y se ha estudiado su efecto sobre la proliferación celular combinándolo con el de los metales pesados cadmio y mercurio. A continuación vamos a hacer un balance de todos los resultados anteriormente obtenidos explicando el efecto de los campos magnéticos, el de los iones metálicos y el efecto combinado de ambos sobre la proliferación celular.

En los grupos tratados con iones metálicos, cadmio y mercurio tanto sin exponer a campo magnético como los expuestos a campos magnéticos de

0,5 A, 1 A y 1,5 A se observa que la concentración de metal tóxico para las células es 10^{-3} M, a esta concentración la proliferación celular es muy similar al blanco.

Si comparamos los linfocitos sin tratar con metal con los linfocitos tratados con diferentes concentraciones de cadmio y de mercurio, se observa tanto en el grupo (control) sin exponer a campo magnético como en los expuestos a campos magnéticos de diferentes intensidades, una disminución de la proliferación celular a medida que aumenta la concentración de ión metálico siendo significativa para la concentración de metal $\geq 10^{-5}$ M. Para las concentraciones de cadmio o mercurio de 10^{-6} M y 10^{-7} M no se detectan cambios significativos en la proliferación celular con respecto al grupo sin tratamiento químico. Si comparamos el efecto de los dos metales, con mercurio se produce un ligero aumento de la proliferación celular a todas las concentraciones estudiadas pero no es significativo.

Si estudiamos el efecto del campo magnético en linfocitos sin ningún tratamiento químico se observa que a la intensidad de 0,5 A no se detectan cambios significativos en la proliferación celular, a la intensidad de 1 A se detecta un aumento de la proliferación pero no es significativa y a la intensidad de 1,5 A se produce una disminución significativa de la

proliferación celular debido a un aumento de temperatura en los cultivos expuestos a campos magnéticos.

Si analizamos el efecto combinado del campo magnético con el ión metálico, se obtiene que, a la intensidad de CM de 0,5 A no se observan cambios significativos entre el grupo no expuesto y el grupo expuesto a campo magnético a ninguna de las concentraciones de cadmio o mercurio utilizadas. Con la intensidad de campo magnético de 1 A se produce un aumento de la proliferación celular en el grupo expuesto a campos magnéticos respecto al grupo no expuesto, a todas las concentraciones de cadmio y de mercurio, pero no es significativo. En cuanto a la intensidad de 1,5 A, se detecta una disminución significativa de la proliferación celular en el grupo expuesto respecto al control, no expuesto a las concentraciones de metal $\geq 10^{-4}$ M, debido como se ha comentado anteriormente a un aumento de temperatura en los cultivos expuestos a campos magnéticos de 1,5 A.

En la proliferación celular no se ha observado efecto sinérgico entre el ión metálico (cadmio, mercurio) y el campo magnético aplicado a ninguna de las intensidades utilizadas. Los iones metálicos no potencian la acción del campo magnético, al aumentar la concentración de ión metálico no se detecta un mayor efecto del CM en la proliferación celular.

Relacionando los experimentos de proliferación celular y el ensayo de micronúcleos realizado anteriormente, se concluye que la exposición de linfocitos humanos a campos magnéticos de 50 Hz y distintas intensidades (0,5, 1 A, 1,5A) durante 96 horas no afecta a la frecuencia espontánea de micronúcleos. Tampoco se altera la proliferación celular por la exposición de los linfocitos a campos magnéticos de 0,5 A y 1 A durante 96 horas; sin embargo a la intensidad de 1,5 A disminuye la proliferación celular, pero es por causa de un factor externo, la temperatura.

En lo referente al efecto de los metales, la concentración de 10^{-3} M es muy tóxica, tanto para el cadmio como para el mercurio y no se observan células suficientes para llevar a cabo el ensayo de micronúcleos, a esta concentración la proliferación celular es muy baja, muy similar al blanco.

El cadmio provoca un aumento significativo del número de micronúcleos a las concentraciones de 10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M, respecto del grupo sin tratamiento químico y el mercurio produce cambios significativos en el número de micronúcleos con respecto al control a la concentración de 10^{-4} M y 10^{-5} M.

Con todas las concentraciones de iones metálicos (cadmio, mercurio) estudiadas no se originan cambios en el número de micronúcleos a ninguna intensidad de campo magnético si lo comparamos con el grupo no expuesto.

En la proliferación celular tampoco se producen cambios a ninguna concentración de metal entre el grupo no expuesto y el grupo expuesto a 0,5 A y 1 A; en el caso de intensidad 1,5 A, sí hay cambios, pero se deben al efecto de la temperatura.

Tanto en el ensayo de micronúcleos como en el de proliferación celular al aumentar la dosis de metal no se detecta un mayor efecto de campo magnético sobre los micronúcleos o sobre la proliferación celular, por tanto no se ha observado un efecto sinérgico entre el ión metálico (cadmio, mercurio) y el campo magnético.

V.1.2. Sangre humana sometida a campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y diferentes intensidades (0,25 A , 0,5 A y 1 A)

En este experimento se pretende estudiar el efecto del campo magnético de 50 Hz a diferentes intensidades (0,25 A, 0,5 A y 1,5 A) en sangre humana. Para valorar el efecto del campo magnético (CM) se determinan diversos parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo a diferentes tiempos de exposición (0h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h).

Los parámetros bioquímicos analizados son: proteínas totales, glucosa, urea, calcio, fósforo y hierro. No se observaron cambios significativos a ninguna intensidad de campo magnético con respecto al suero control en ninguno de ellos. En este caso se va a estudiar a modo de ejemplo la evolución de las proteínas totales y el fósforo a diferentes intensidades de campos magnéticos y a diferente tiempo de exposición.

Los parámetros analizados son las actividades enzimáticas de: láctico deshidrogenasa, creatina fosfoquinasa, fosfatasa alcalina, glutámico oxalacético transaminasa, glutámico pirúvico transaminasa y gammaglutamil transpeptidasa. De todas las enzimas evaluadas, no se detectaron cambios significativos con respecto al control a ninguna intensidad de CM, por ello se

va a representar a modo de ejemplo la evolución de la enzima láctico deshidrogenasa bajo la influencia de los campos magnéticos.

V.1.2.1. Datos enzimáticos y bioquímicos en sangre tratada con campos magnéticos de 50 Hz e intensidad 0,25 A, 0,5 A y 1 A, a diferentes tiempos de exposición.

Para estudiar la evolución de las proteínas totales, fósforo y láctico deshidrogenasa, se van a tener en cuenta la intensidad de campo magnético y el tiempo de exposición.

V.1.2.1.1. Campo magnético de 50 Hz y 0,25 A

Proteínas Totales

Se representa la evolución de la concentración de proteínas totales en sangre expuesta a campo magnético de 50 Hz e intensidad 0,25 A en comparación con la sangre control a diferentes tiempos de incubación. (Figura 1).

1). La concentración de proteínas totales se expresa en g/100mL.

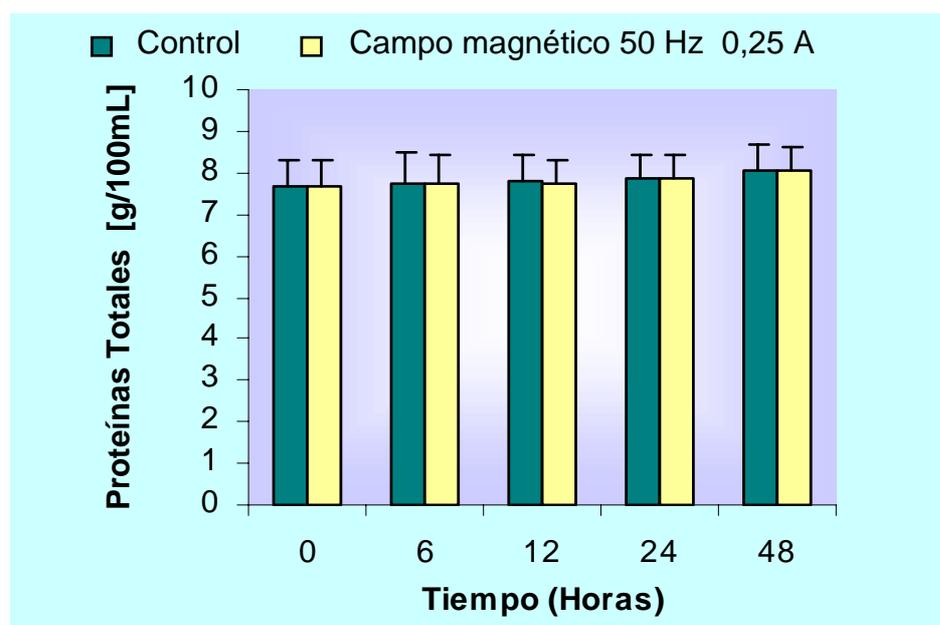


Figura 1. Proteínas totales en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 0,25 A de intensidad a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 1 no se observa ningún cambio significativo en la concentración de proteínas totales de la sangre expuesta a campos magnéticos en comparación con la sangre control, sin exposición a CM. Tampoco se

detectan cambios significativos en la concentración de proteínas totales del grupo control a diferentes tiempos de incubación, ni en las proteínas totales del grupo expuesto a diferentes tiempos de exposición. La concentración de proteínas totales tanto en el grupo control como en el expuesto se mantiene constante a lo largo de todo el experimento.

Fósforo

Se representa la evolución de la concentración de fósforo en sangre tratada con campos magnéticos de 50 Hz e intensidad 0,25 A en comparación con la sangre control, a diferentes tiempos de incubación (Figura 2). La concentración de fósforo se expresa en mg/100mL.

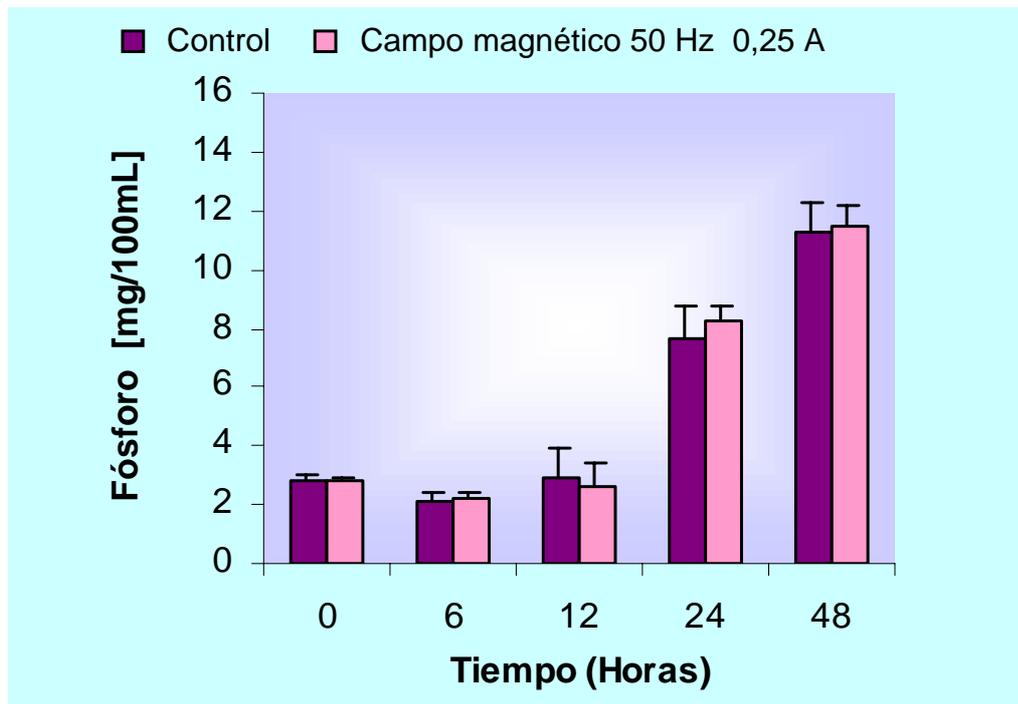


Figura 2. Fósforo en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 0,25 A de intensidad a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 2 no se observan diferencias significativas entre la concentración de fósforo de la sangre control y de la sangre expuesta a campos magnéticos de 0,25 A, a ningún tiempo de incubación.

A partir de las 12 h se observa tanto en el grupo control como en el tratado, un incremento de la concentración de fósforo con respecto al inicio del experimento. Este aumento es significativo a las 24 y 48 horas ($p < 0,05$), aunque es más acusado en éste último.

Láctico deshidrogenasa

Se representa la evolución de la actividad de la enzima láctico deshidrogenasa en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 0,25 A en comparación con la sangre control a diferentes tiempos de incubación (Figura 3). La actividad enzimática de la láctico deshidrogenasa se expresa en U/L.

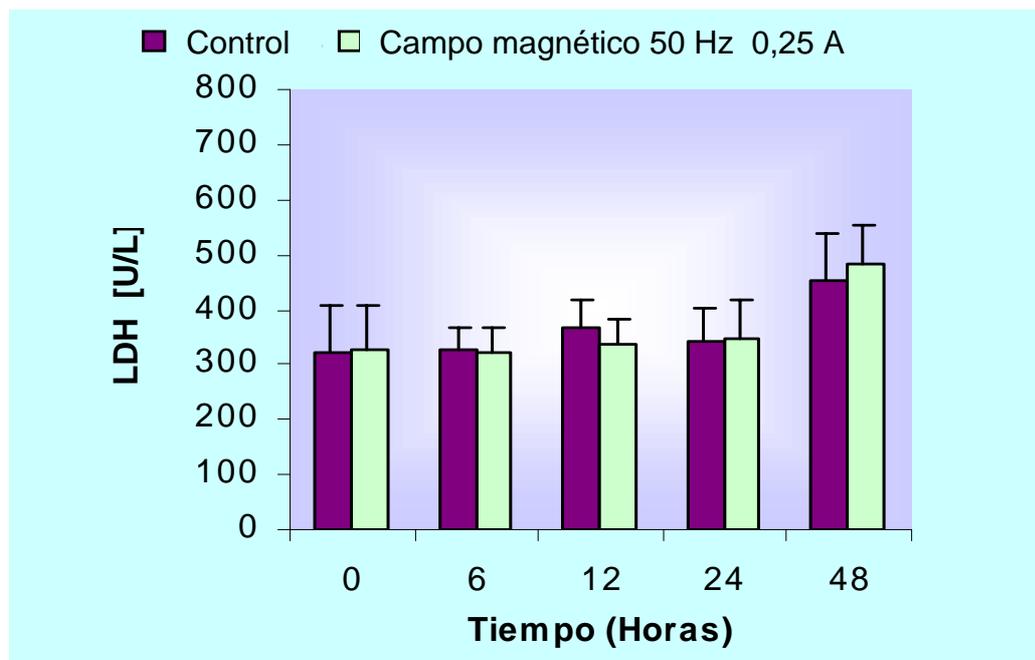


Figura 3. Actividad enzimática de la láctico deshidrogenasa en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 0,25 A de intensidad a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 3 no se observa ningún cambio significativo en la concentración de LDH entre la sangre expuesta y la sangre control, sin exposición; siendo análogos los valores correspondientes al grupo control y al tratado. En ambos grupos se produce un ligero incremento de la concentración de LDH a medida que aumenta el tiempo de incubación, pero no es significativo.

V.1.2.1.2. Campo magnético de 50 Hz y 0,5 A

Proteínas Totales

Se representa la evolución de la concentración de proteínas totales en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 0,5 A en comparación con la sangre control a diferentes tiempos de incubación (Figura 4).

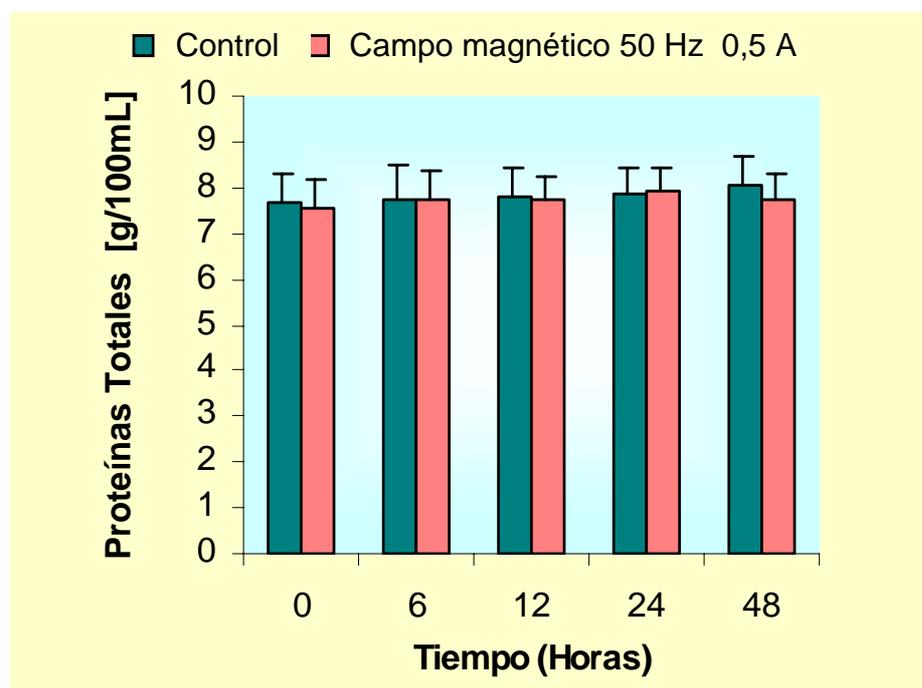


Figura 4. Proteínas totales en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 0,5 A de intensidad a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 4 no se observa ningún cambio significativo en la concentración de proteínas totales de la sangre expuesta a campos magnéticos de 0,5 A en comparación con la sangre control a ningún tiempo de incubación, del mismo modo que ocurría con los campos magnéticos de 0,25 A. Tampoco se detectan cambios significativos en la concentración de proteínas totales del grupo control a diferentes tiempos de incubación, ni en las proteínas totales del grupo expuesto a diferentes tiempos de exposición.

Fósforo

Se representa la evolución de la concentración de fósforo en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 0,5 A en comparación con la sangre control, a diferentes tiempos de incubación (Figura 5).

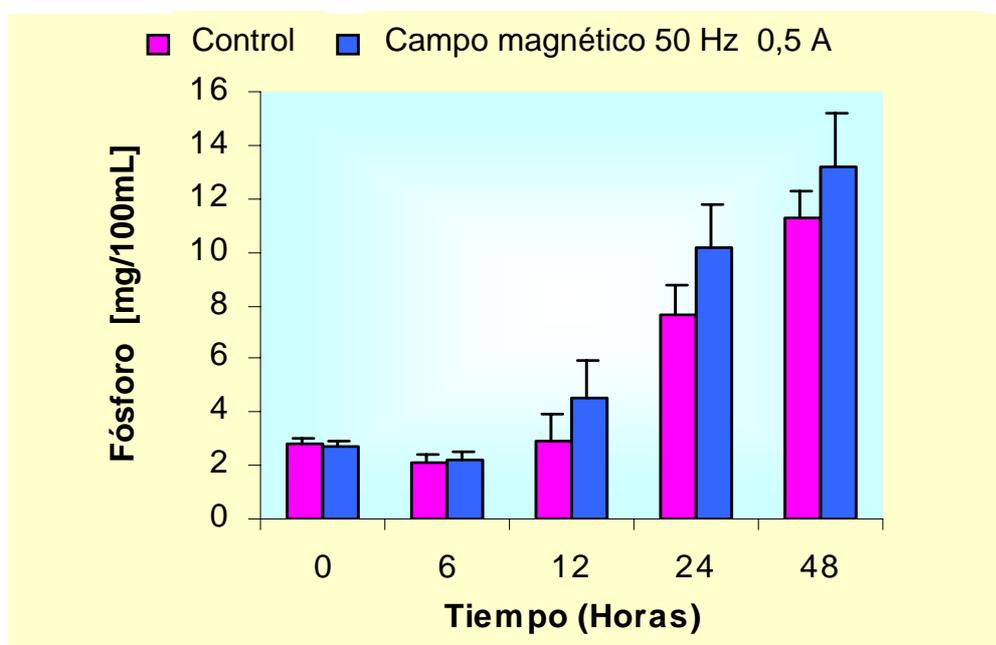


Figura 5. Fósforo en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 0,5 A de intensidad a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 5 se observa que a medida que es mayor el tiempo de incubación, la concentración de fósforo tiende a aumentar, tanto en el grupo control como en el grupo tratado. Se detectan cambios significativos ($p < 0,05$)

a las 24 y 48 horas con respecto a las 0 horas de incubación en ambos grupos, control y tratado.

Se produce un incremento de la concentración de fósforo en el grupo expuesto comparado con el control a partir de las 12 horas de incubación, pero no es significativo.

Láctico deshidrogenasa

Se representa la evolución de la concentración de láctico deshidrogenasa en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 0,25 A en comparación con la sangre control a diferentes tiempos de incubación (Figura 6).

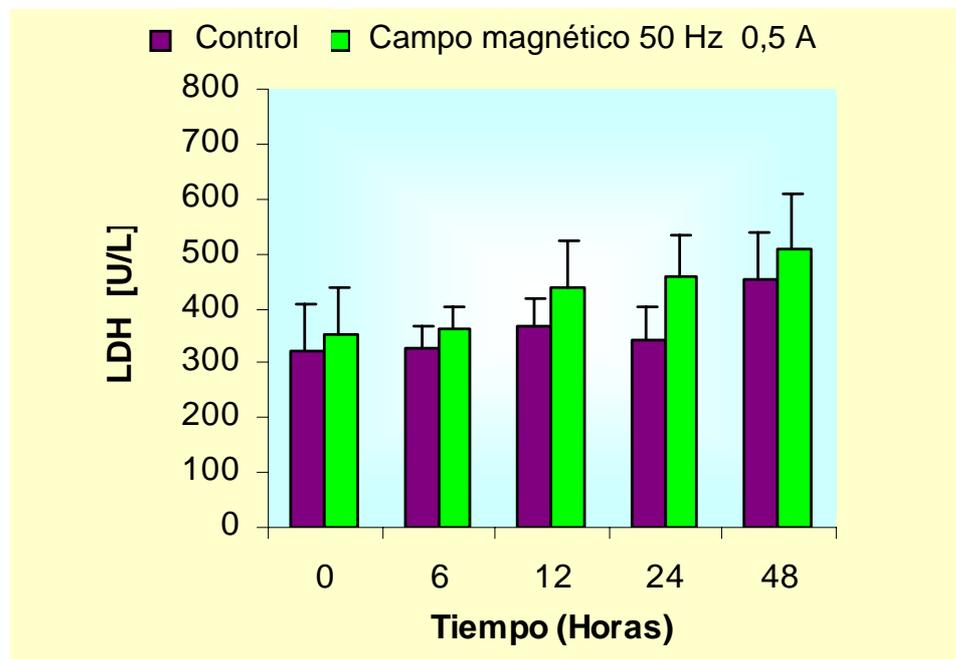


Figura 6. Actividad enzimática de la láctico deshidrogenasa en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 0,5 A de intensidad, a diferentes tiempos de incubación.

En el grupo expuesto se detecta un incremento de la concentración de LDH a medida que aumenta el tiempo de exposición, pero no es significativo.

También se produce un aumento de la concentración de LDH en el grupo expuesto con respecto al grupo control, aunque tampoco es significativo.

V.1.2.1.3. Campo magnético de 50 Hz y 1 A

Proteínas Totales

Se representa la evolución de la concentración de proteínas totales en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 1 A en comparación con la sangre control a diferentes tiempos de incubación (Figura 7).

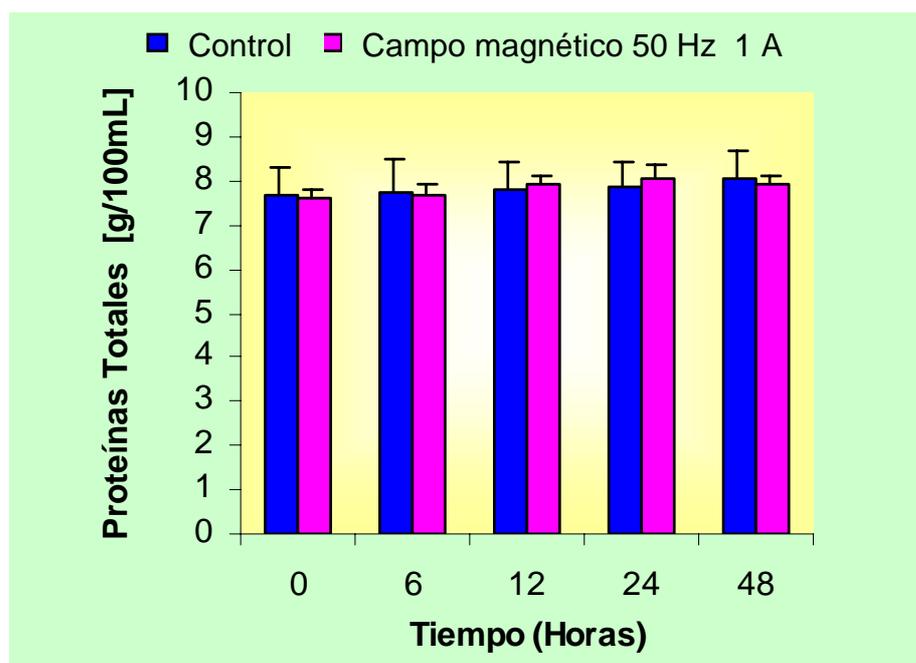


Figura 7. Proteínas totales en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 1 A de intensidad a diferentes tiempos de incubación.

No se observa ningún cambio significativo en la concentración de proteínas totales entre la sangre expuesta a campo magnético de 1 A y la sangre control, igual que se ha visto anteriormente con los campos magnéticos de 0,5 A y 0,25 A.

Fósforo

Se representa la evolución de la concentración de fósforo en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 1 A en comparación con la sangre control a diferentes horas de incubación (Figura 8).

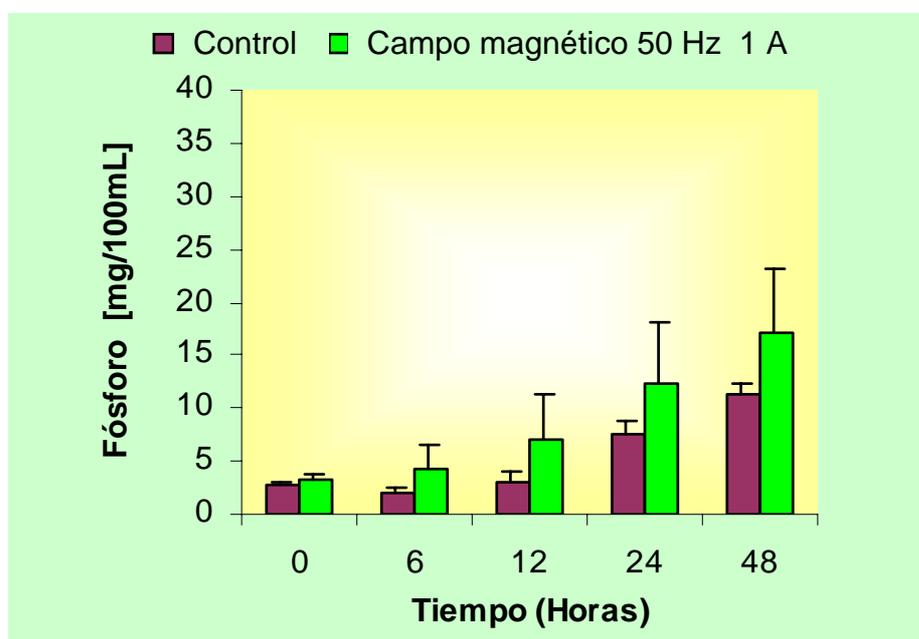


Figura 8. Fósforo en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 1 A de intensidad, a diferentes tiempos de incubación.

En la figura 8 se observa que a medida que es mayor el tiempo de incubación la concentración de fósforo tiende a aumentar, tanto en el grupo control como en el grupo tratado. Se detectan cambios significativos ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas de incubación con respecto a las 0 horas, en ambos grupos, control y tratado.

Se produce un incremento de la concentración de fósforo en el grupo expuesto comparado con el control a todas las horas de incubación, pero no es estadísticamente significativo.

Láctico deshidrogenasa

Se representa la evolución de la actividad de la enzima láctico deshidrogenasa en sangre tratada con campo magnético de 50 Hz e intensidad 1 A en comparación con la sangre control a diferentes tiempos de incubación (Figura 9).

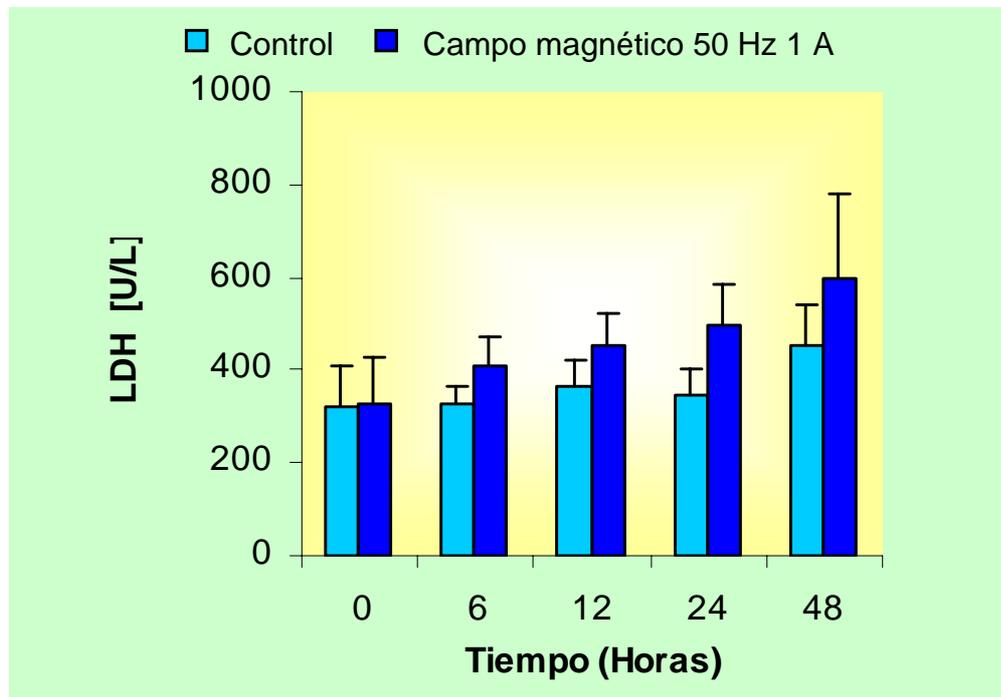


Figura 9. Actividad de la enzima láctico deshidrogenasa en sangre control y tratada con campo magnético de 50 Hz y 1 A de intensidad, a diferentes tiempos de exposición.

En la sangre tratada se detecta un incremento de la actividad de LDH a medida que aumenta el tiempo de exposición, pero este aumento no es significativo si lo comparamos con las 0 horas de exposición.

Los valores de LDH en la sangre tratada son mayores que la sangre control a todos los tiempos de incubación, pero este aumento no es significativo para ningún tiempo de incubación.

V.1.2.2. Estudio comparativo de los datos bioquímicos y enzimáticos a las diferentes intensidades de campo magnético.

Después de estudiar una por una las variaciones de los campos magnéticos de 0,25, 0,5 y 1A de intensidad con respecto al control para las proteínas totales, fósforo y láctico deshidrogenasa se va a realizar un estudio comparativo de los campos magnéticos a las tres intensidades estudiadas. Se representan de forma global los valores de las proteínas totales correspondientes a CM de 0,25 A, 0,5 A y 1 A (Figura 10).

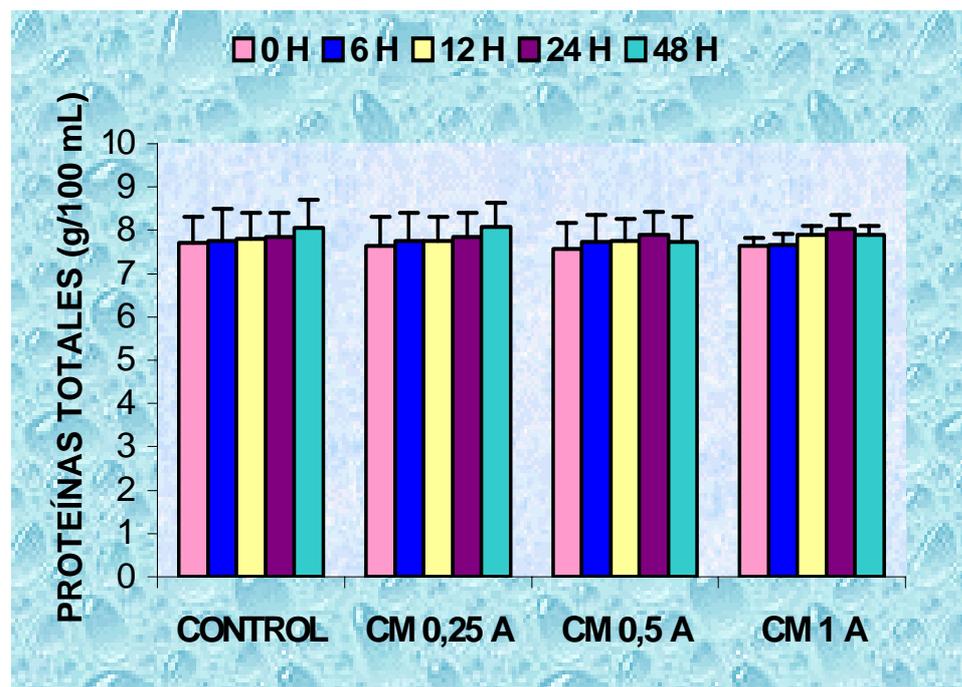


Figura 10. Comparación de los niveles de proteínas totales en sangre tratada con campos magnéticos de diferentes intensidades: 0,25 A, 0,5 A y 1 A.

No existen cambios significativos en las proteínas totales a ninguna intensidad de campo magnético estudiado tanto si lo comparamos con el control como si comparamos los valores de proteínas totales a diferentes intensidades de CM. Las proteínas totales se mantienen prácticamente constantes independientemente del tiempo de incubación.

A continuación se representan los valores de fósforo correspondientes a campos magnéticos de 0,25 A, 0,5 A y 1 A (Figura 11).

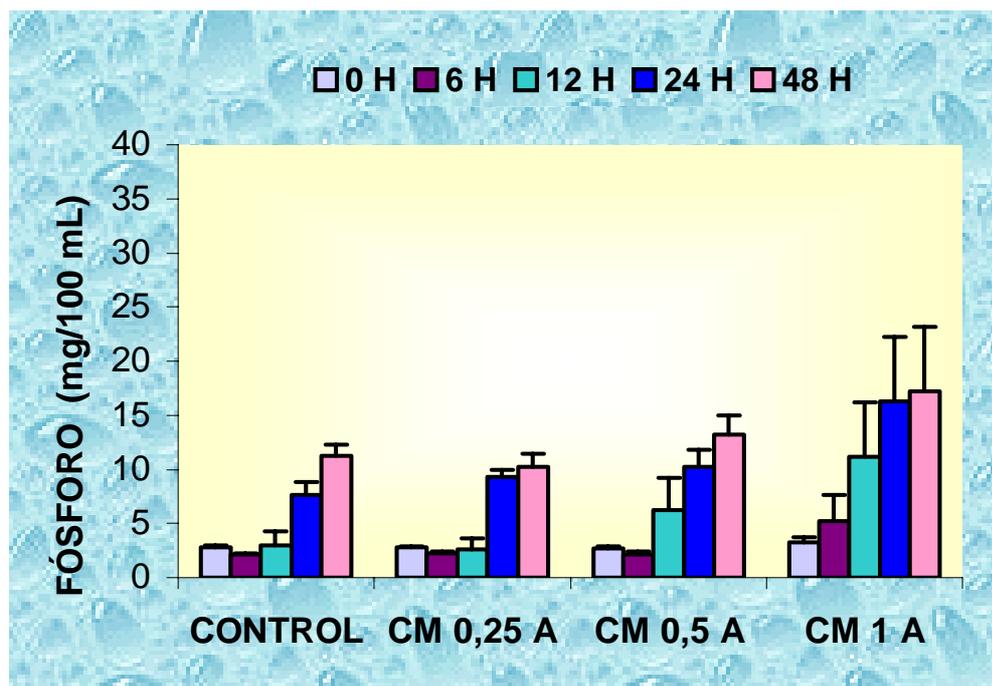


Figura 11. Comparación de los niveles de fósforo en sangre tratada con campos magnéticos de diferentes intensidades: 0,25 A, 0,5 A y 1 A.

En el grupo control y en cada uno de los grupos tratados con diferentes intensidades de campo magnético estudiadas, no se detectan variaciones de la concentración de fósforo a las 6 horas de exposición. Se produce un aumento de la concentración de fósforo a las 12 h de con los campos magnéticos de 0,5 y 1 A pero no es significativo. Se observan cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a las 24 y 48 horas de incubación con respecto a las 0 horas, tanto en el grupo control como en cada uno de los grupos tratados con CM.

Si comparamos el grupo control con los grupos expuestos a campo magnético, se observa un incremento en la concentración de fósforo a partir de las 12 horas de incubación a medida que aumentamos la dosis de CM, obteniéndose los valores máximos con 1 A de intensidad, pero este aumento no es significativo para ninguna de las intensidades de campo magnético estudiadas.

Se representan los niveles enzimáticos de láctico deshidrogenasa correspondientes a campos magnéticos de 0,25 A, 0,5 A y 1 A (Figura 12).

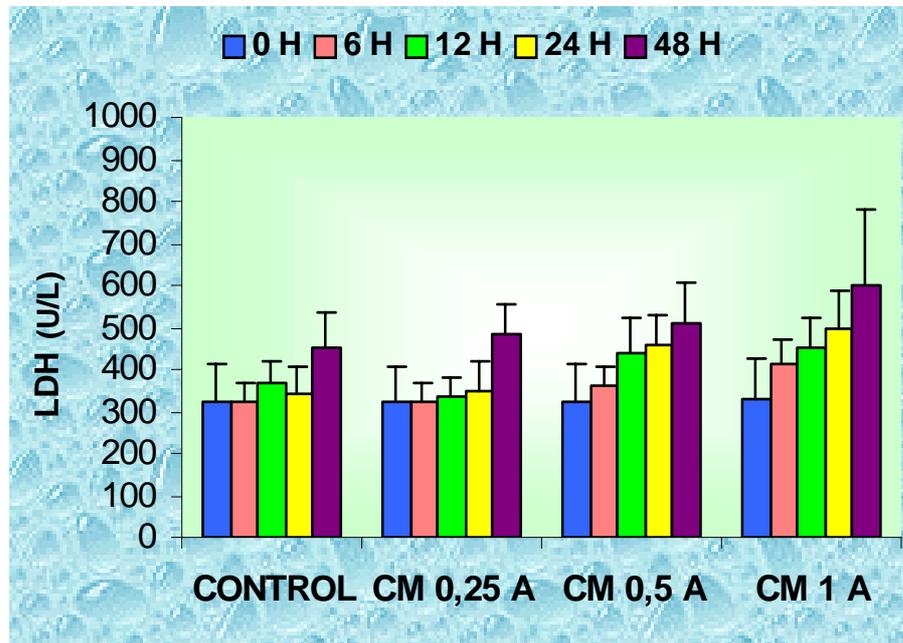


Figura 12. Comparación de las actividades enzimáticas de láctico deshidrogenasa en sangre tratada con campos magnéticos de diferente intensidad: 0,25 A, 0,5 A y 1 A.

Si se compara el grupo control y los grupos tratados con campos magnéticos de diversas intensidades, se observa que con el grupo de 0,25 A no hay prácticamente diferencias, son muy parecidos; y si comparamos el control con el grupo de 0,5 A y 1 A se detecta un ligero incremento de la actividad de la LDH a partir de las 6 H aunque no es significativo en ninguno de los dos casos. Por tanto, no se producen cambios significativos en la actividad de la láctico deshidrogenasa en la sangre tratada con campos magnéticos de diversas intensidades (0,25 A, 0,5 A y 1 A), si lo comparamos con la sangre control, sin exposición.

V.1.3. Efecto de campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz y 27,5 G) en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratón. Efecto combinado de los campos magnéticos y sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la barrera.

Se determina la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratones expuestos a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT). La permeabilidad se evalúa por el paso del colorante vital rojo neutro, inyectado por vía intravenosa, al cerebro.

También se estudia el efecto combinado de los campos magnéticos y el metal pesado mercurio en la permeabilidad de la barrera.

V.1.3.1. Espectro de absorción del colorante vital rojo neutro

Antes de realizar la lectura espectrofotométrica de los extractos de cerebro de ratón debemos determinar la longitud de onda adecuada para la determinación colorimétrica del rojo neutro.

Para saber a que longitud de onda se deben medir las muestras se registra el espectro ultravioleta y visible del rojo neutro para conocer su pico

máximo de absorción mediante un espectrofotómetro acoplado a un programa de ordenador (Figura 1, Figura 2).

Para ello se utiliza una disolución de rojo neutro (Sigma Ref: 7005) en NaCl 0,8% a la concentración de $5\mu\text{g/mL}$.

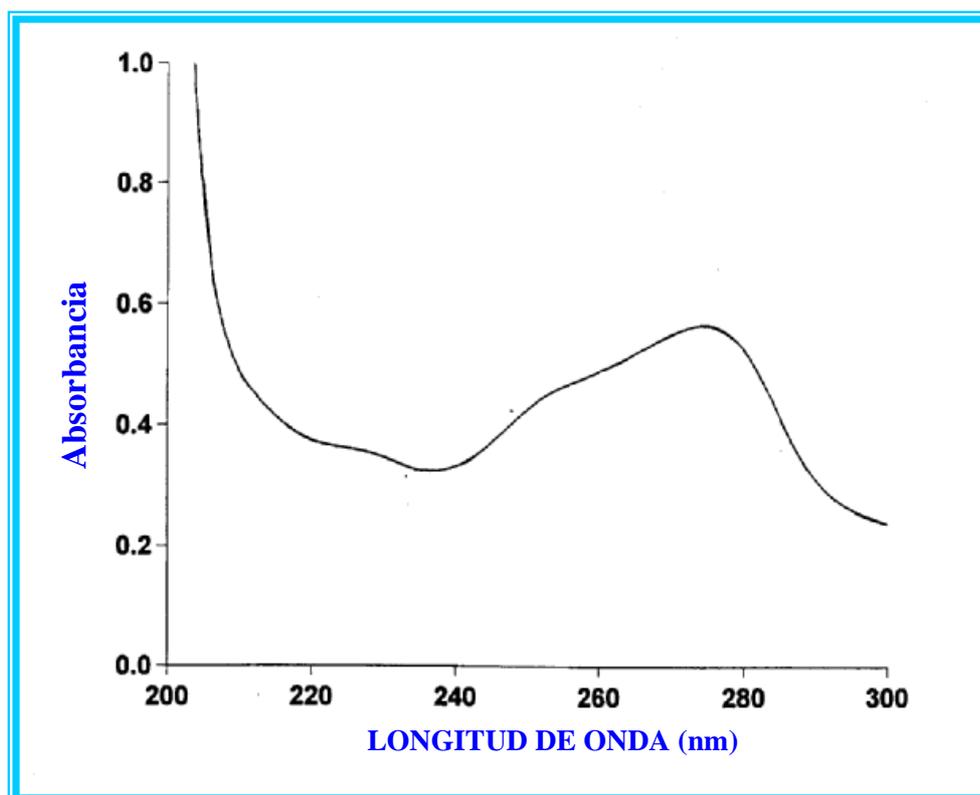


Figura 5. Espectro ultravioleta del rojo neutro.

En el espectro ultravioleta del rojo neutro se observa un pico de máxima absorción a 275nm.

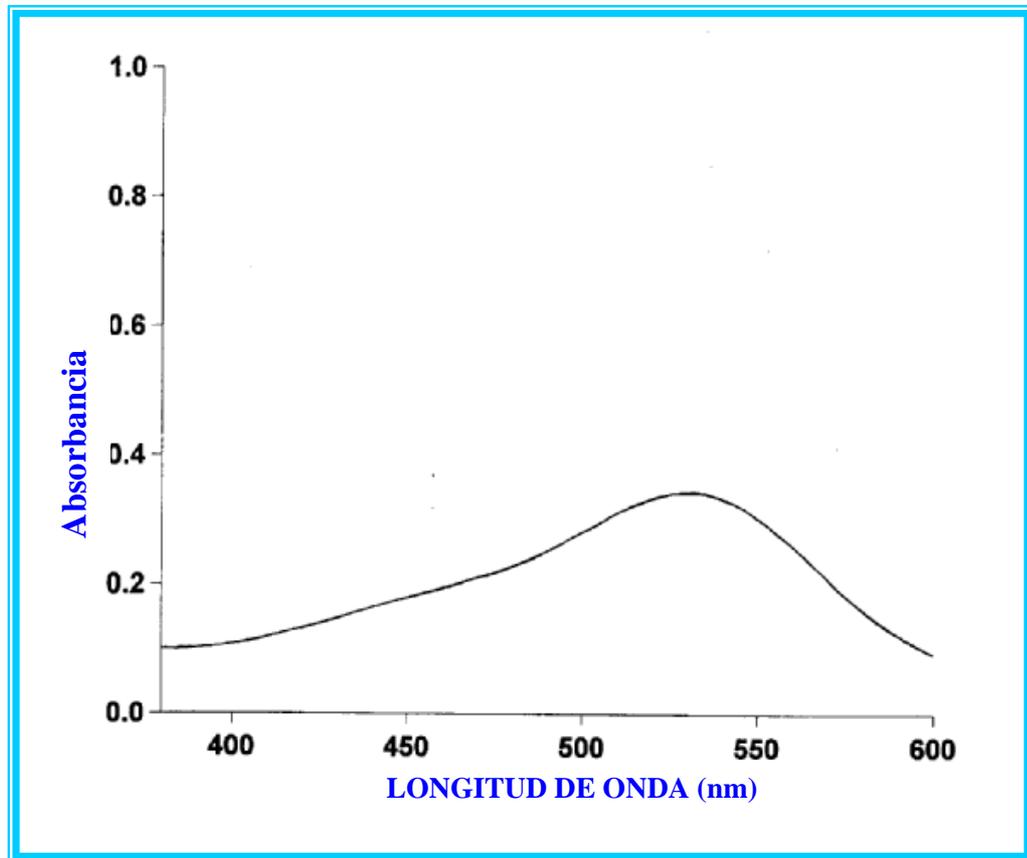


Figura 6. Espectro visible del rojo neutro.

En el espectro visible del rojo neutro se detecta un pico máximo de absorción bien definido a la longitud de onda de 540nm.

Se utiliza la longitud de onda de 540 nm para la lectura colorimétrica del rojo neutro, ya que en el espectro ultravioleta, a la longitud de onda a la que absorbe el rojo neutro, van a absorber también las proteínas, por lo que puede haber interferencias.

Una vez establecida la longitud de onda a la que se va a medir el rojo neutro (540 nm), se realiza la lectura correspondiente a este colorante vital en los extractos de cerebro de ratón expuestos a campos magnéticos.

V.1.3.2. Determinación colorimétrica del rojo neutro en cerebro de ratón expuesto a campos magnéticos con y sin sobrecarga de mercurio.

Los cerebros de ratones expuestos a campos magnéticos y controles con y sin tratamiento de sobrecarga de mercurio, después de someterse a homogeneización, centrifugación y filtración se analizan en el espectrofotómetro a la longitud de onda 540 nm para obtener la absorción del rojo neutro.

De esta forma se cuantifica el pico correspondiente al rojo neutro que nos proporciona el valor del colorante ingresado en el cerebro. Se obtiene por tanto una medida de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en cada uno de los animales.

El extracto sobrenadante del cerebro control, sin rojo neutro y en ausencia de campo magnético se toma como blanco para la lectura del pico del rojo neutro en el espectro visible (540 nm), de cada una de las muestras.

En la figura 3 se muestra la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro en cerebro de ratones control (control) y sometidos a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (CM).

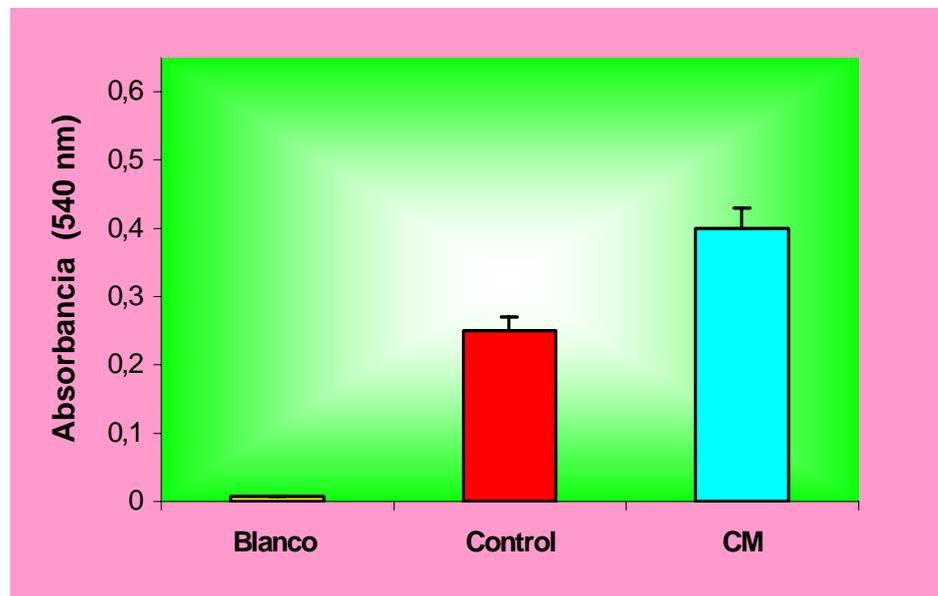


Figura 3. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro en cerebro de ratones con y sin exposición a campos magnéticos (50 Hz y 27,5 G).

Los valores presentados en la figura 3 son la media \pm desviación estándar de los resultados obtenidos de un total de cinco experimentos que se realizan en las mismas condiciones.

En la gráfica se representa el blanco correspondiente al cerebro control sin rojo neutro, para el que se obtiene un valor cero de absorbancia.

La absorbancia del rojo neutro es una medida de la cantidad de colorante ingresado en el cerebro, y por tanto, también es una forma de evaluar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Si se comparan los cerebros de ratones control (control) y los de ratones expuestos a campos magnéticos (CM) se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de la absorbancia del rojo neutro que indica un aumento significativo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

En la figura 4 se muestra la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro en cerebro de ratones tratados con sobrecarga de mercurio y sin exposición a campos magnéticos (Hg) y ratones tratados con sobrecarga de Hg y sometidos a CM de 50 Hz, 27,5 G (Hg CM).

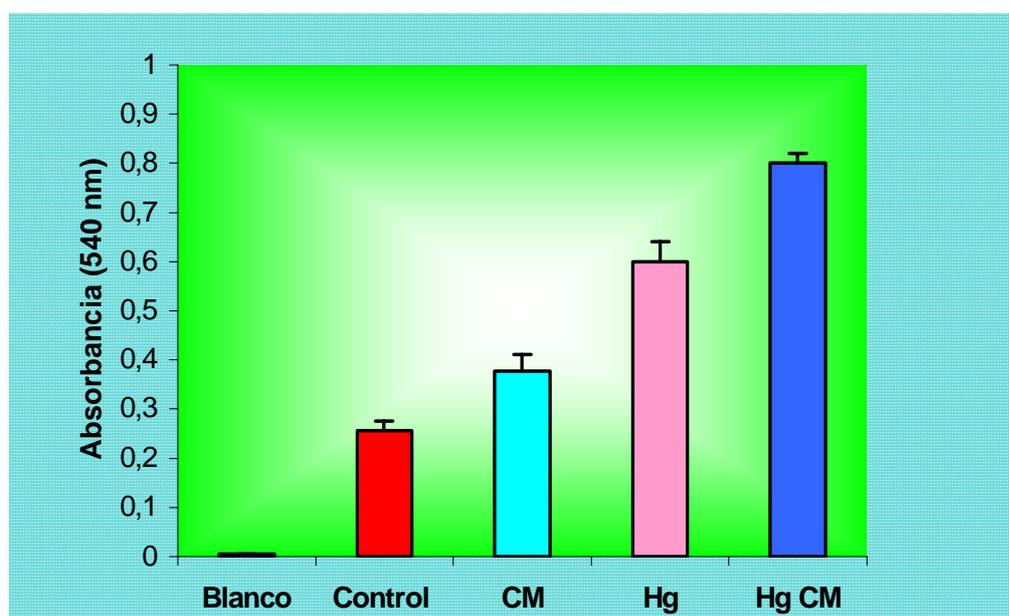


Figura 4. Permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro en cerebro de ratones tratados con sobrecarga de mercurio, con y sin exposición a campos magnéticos de 50 Hz, 27,5 G.

Primeramente vamos a analizar el efecto del tratamiento con sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica de ratón. Si comparamos los cerebros de ratones control (control) y los de ratones tratados con mercurio (Hg), ambos en ausencia de CM, se observa un incremento significativo ($p < 0,05$) de la absorbancia del rojo neutro que indica un aumento significativo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con el tratamiento con sobrecarga de mercurio.

Si se comparan los cerebros de ratones no expuestos a campos magnéticos (Hg) y los de ratones expuestos a campos magnéticos (Hg CM), ambos sometidos al tratamiento con mercurio, se observa un incremento

significativo ($p < 0,05$) de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica para el colorante vital rojo neutro.

Se detecta un aumento significativo ($p < 0,05$) de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro entre los cerebros de ratones control (sin tratamiento con mercurio y sin someter a campo magnético) y los cerebros de ratones con tratamiento con mercurio y sometidos a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (Hg CM).

Como conclusión se puede decir que el tratamiento con sobrecarga de mercurio induce un aumento significativo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro y que la exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G provoca también un incremento significativo de la permeabilidad de la BHE. El efecto combinado del tratamiento con mercurio y la exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (Hg CM) produce un aumento significativo de la permeabilidad de la BHE con respecto al control (sin mercurio y sin campo magnético), con respecto al grupo tratado solamente con mercurio (Hg), y también con respecto al grupo tratado solo con los campos magnéticos (CM). Por tanto se produce sinergismo en la exposición conjunta de mercurio y los campos magnéticos de 50 Hz, obteniendo como resultado un aumento de la permeabilidad de la BHE de ratón.

V.2. CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS DE RADIOFRECUENCIA.

V.2.1. *Aplicación de campos electromagnéticos de radiofrecuencia (2,45 GHz) en ratas.*

El objetivo de este experimento es estudiar la variación de las propiedades eléctricas conductividad y permitividad de distintos tejidos de rata expuestos a campos electromagnéticos de radiofrecuencia, concretamente 2,45 GHz después de haber sometido a diferentes grupos de animales a un tratamiento con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

V.2.1.1. Control analítico de los grupos de ratas tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

En la tabla 1 se presentan los parámetros hematológicos del grupo de ratas control y los tratados con cadmio y con mercurio.

En los dos grupos de ratas tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la hemoglobina y el hematocrito con respecto al grupo control.

El tratamiento con los metales, cadmio y mercurio provoca una disminución de la hemoglobina y hematocrito que indica la aparición de un

estado anémico. En el caso del cadmio, éste tiene una elevada afinidad por la hemoglobina, de forma que compite con el hierro para unirse a ella, también afecta a la médula ósea y al metabolismo de los eritrocitos.

En las plaquetas no se producen cambios significativos con respecto al grupo control en ninguno de los grupos tratados.

PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS	CONTROL	CADMIO	MERCURIO
Eritrocitos ($10^6/\text{mm}^3$)	7,05±0,49	5,7±1	5'54±0'5*
Hemoglobina (g/dL)	12,75±0,35	9,97±1,5*	10'4±1'5*
Hematocrito (%)	37,30±0,8	31,8±5,1*	31'8±3'07*
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	896±48,9	1214±41	789'3±213

Tabla 1. Parámetros hematológicos del grupo de ratas control y de los grupos tratados con cadmio y con mercurio.

* $p < 0,05$. Diferencias significativas con respecto al grupo control.

En cuanto a los parámetros bioquímicos (tabla 2) se producen cambios estadísticamente significativos ($p < 0,05$) con respecto al grupo control en la glucosa tanto en el grupo tratado con cadmio como en el tratado con mercurio. En los demás parámetros bioquímicos estudiados: proteínas totales, albúmina, urea, bilirrubina, calcio, hierro, fósforo y magnesio no se detectan cambios significativos respecto al grupo control para ninguno de los dos grupos tratados con metal.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	CONTROL	CADMIO	MERCURIO
Glucosa (g/100mL)	166±13	109±3,5*	123'6±17*
Proteínas totales (g/100mL)	6,3±0,2	5,96±0,61	5'3±1'66
Albúmina (mg/100mL)	3,7±0,12	2,35±0,2	2'4±0'64
Urea (mg/100mL)	33±2	39±15,26	37'3±4'49
Bilirrubina total (mg/100mL)	0,25±0,05	0,575±0,54	0'3±0'08
Calcio sérico (mg/100mL)	11,7±0,9	10,17±1,17	9'4±2'39
Hierro sérico (µg/100mL)	116,6±13	100,5±28,8	93'4±11'3
Fósforo (mg/100mL)	7,5±1,3	7,55±0,25	6'2±1'2
Magnesio (mg/100mL)	2,2±0,33	2,65±0,47	1'87±0'38

Tabla 2. Paramétros bioquímicos en suero de ratas control y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

*p<0,05. Diferencias significativas con respecto al grupo control.

Se representa la actividad enzimática expresada en U/L de las enzimas séricas: GOT, GPT,GGT, LDH y CPK en los grupos de ratas tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio (Figura 1).

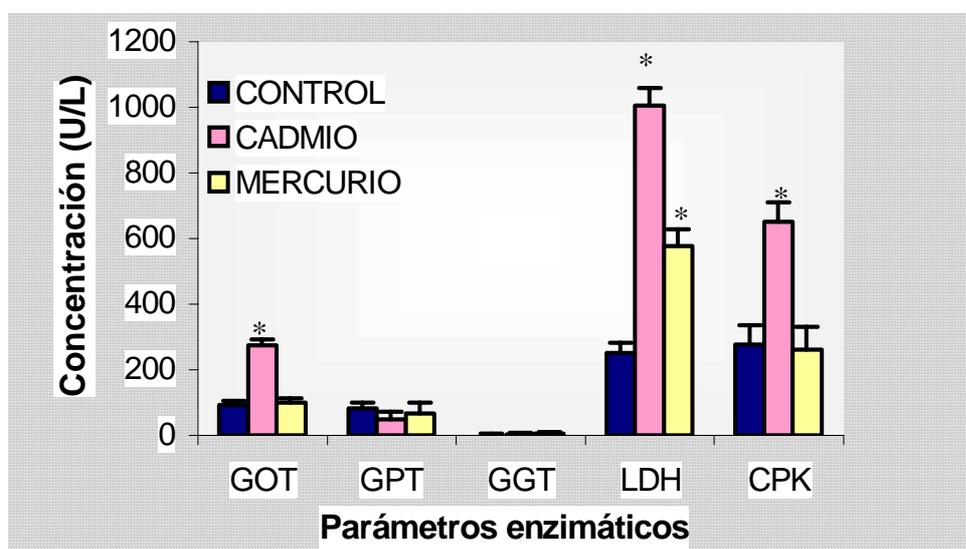


Figura 1. Parámetros enzimáticos en suero de ratas control y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,05$. Diferencias significativas con respecto al grupo control.

El análisis enzimático (Figura 1) revela un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de las actividades enzimáticas de GOT, LDH y CPK en el grupo tratado con cadmio con respecto al control.

La transaminasa GOT, y la zincmetaloenzima LDH están aumentadas siendo indicativo de daño hepático por acumulación de este metal en el hígado. La enzima creatinfosfoquinasa (CPK) implicada en la producción de energía muscular mediante la síntesis de ATP, está también incrementada, lo que indica daño muscular. Las demás enzimas no sufren ninguna variación significativa.

En el tratamiento con mercurio se detecta un aumento significativo ($p < 0,05$) de la actividad enzimática de la láctico deshidrogenasa con respecto al control. Las demás enzimas no muestran cambios significativos.

V.2.1.2. Determinación de las propiedades eléctricas (Permitividad y Conductividad) en tejidos de ratas sometidas a tratamiento con sobrecarga de iones cadmio y de mercurio.

A continuación se presentan las propiedades eléctricas de los tejidos (Permitividad y Conductividad) en el grupo de ratas control y en los grupos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio (Tabla 3, Tabla 4). Los tejidos estudiados en todos los casos son hígado, riñón, pulmón, páncreas y músculo.

Los valores de la conductividad vienen expresados en siemens por metro (S/m).

<i>Tejido</i>	<i>PERMITIVIDAD (ϵ)</i>		
	<i>Control</i>	<i>Cadmio</i>	<i>Mercurio</i>
Hígado	42,60±0,06	40,50±0,80	43,70±1,36
Riñón	49,84±1,09	44,17±0,98	47,50±1,23
Pulmón	47,36±0,69	40,75±1,33	41,25±1,23
Páncreas	41,70±0,78	51,99±1,04	44,30±1,03
Músculo	49,50±0,64	45,67±1,37	47,50±0,84

Tabla 3. Valores medios de la permitividad \pm DE de varios tejidos en el grupo control y en los grupos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

<i>Tejido</i>	<i>CONDUCTIVIDAD (σ)</i>		
	<i>Control</i>	<i>Cadmio</i>	<i>Mercurio</i>
Hígado	1,52±0,08	1,35±0,18	1,17±0,05
Riñón	1,77±0,21	1,08±0,10	1,42±0,18
Pulmón	1,64±0,09	1,19±0,09	1,27±0,18
Páncreas	1,58±0,09	1,20±0,13	1,25±0,18
Músculo	1,77±0,05	1,10±0,09	1,13±0,09

Tabla 4 . Valores medios de la conductividad \pm DE de varios tejidos en el grupo control y en los grupos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

Vamos a analizar el efecto de la sobrecarga de cadmio y de mercurio en la permitividad y conductividad de cada uno de los tejidos por separado: hígado, riñón, pulmón, páncreas y músculo.

Hígado

En las figuras 2 y 3 se representan respectivamente los valores medios de la permitividad y conductividad \pm DE en hígado de ratas control y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

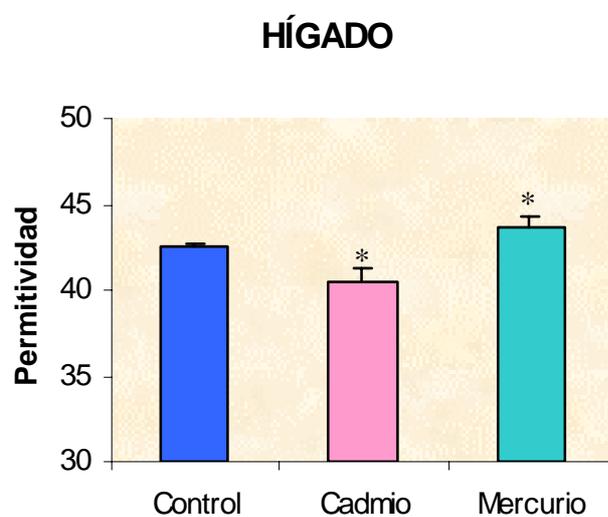


Figura 2. Permitividad en hígado de ratas control y sometidas a una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,05$. Diferencias significativas con el grupo control.

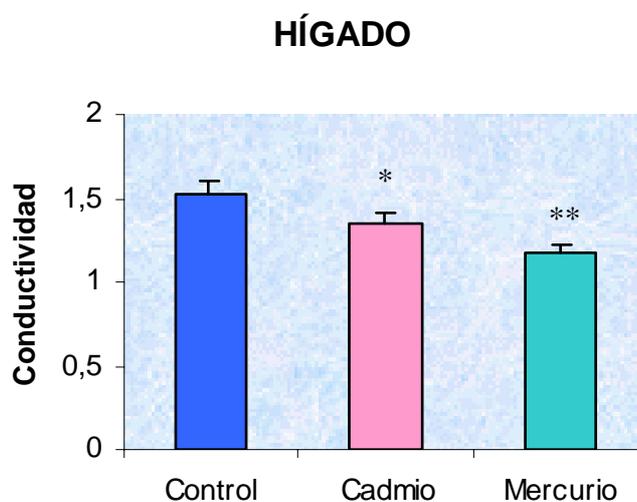


Figura 3. Conductividad en hígado de ratas control y sometidas a una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,05$. Diferencias significativas con el grupo control.

** $p < 0,001$. Diferencias extremadamente significativas con respecto al grupo control.

Como se puede observar en la figura 2, en tejido hepático se producen cambios significativos en la permitividad ($p < 0,05$) tanto en el grupo tratado con cadmio como en el tratado con mercurio. Si comparamos los dos grupos tratados con metal se observa un valor mayor de la permitividad para el mercurio ($p < 0,05$).

En hígado se detecta una disminución de la conductividad en los grupos tratados con metal con respecto al control, siendo significativa ($p < 0,05$) para el grupo tratado con cadmio y extremadamente significativa ($p < 0,001$) para el grupo tratado con mercurio.

Riñón

En las figuras 4 y 5 se exponen respectivamente los valores medios de la permitividad y conductividad \pm DE en riñón de ratas controles y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

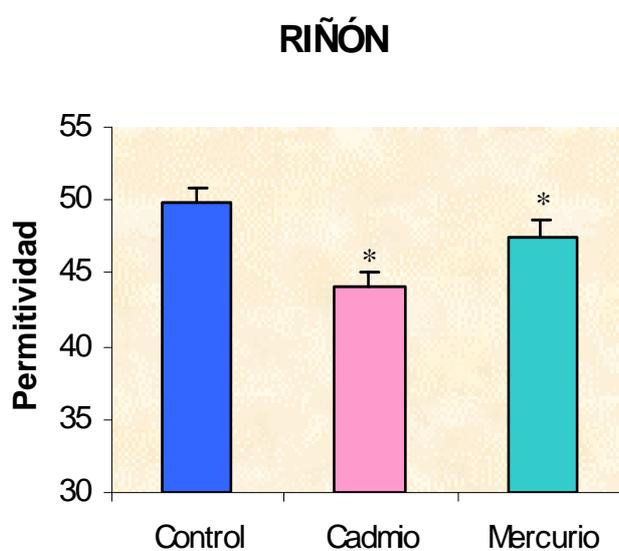


Figura 4. Permitividad en riñón de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio respectivamente.

* $p < 0,001$. Diferencias significativas con el grupo control.

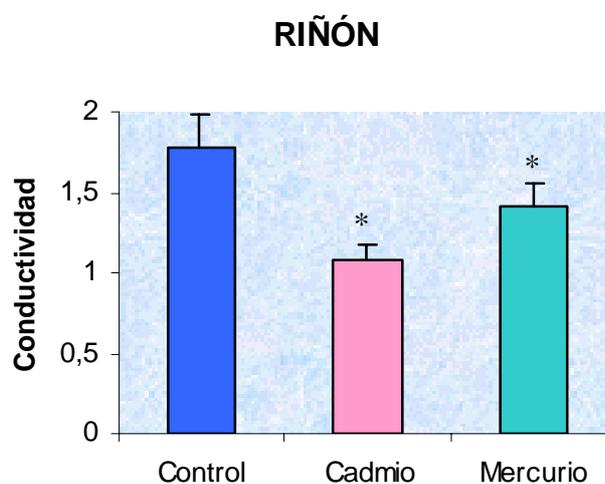


Figura 5. Conductividad en riñón de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio respectivamente.

* $p < 0,001$. Diferencias significativas con el grupo control.

En riñón se observa una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) de la permitividad en los grupos tratados con cadmio y con mercurio, respecto al grupo control. En el caso del grupo tratado con cadmio el valor de la permitividad es menor que el grupo tratado con mercurio.

Por otro lado, la conductividad de tejido renal sufre una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en los grupos tratados con cadmio y con mercurio, respecto al control.

Si comparamos los dos metales entre sí, existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en la conductividad, el grupo tratado con cadmio tiene un valor de conductividad menor que el grupo tratado con mercurio.

Pulmón

En las figuras 6 y 7 se muestran respectivamente los valores medios de la permitividad y conductividad \pm DE en pulmón de ratas control y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

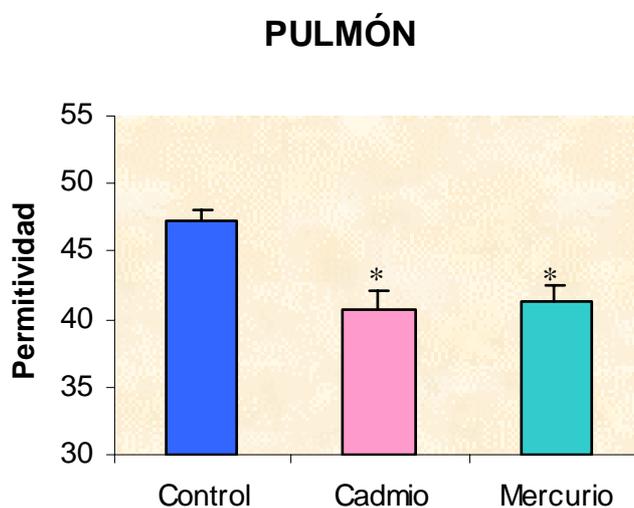


Figura 6. Permitividad en pulmón de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,05$. Diferencias significativas con el grupo control.

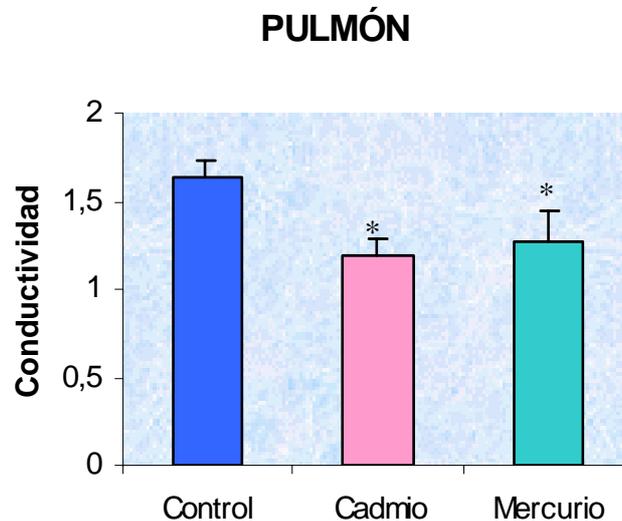


Figura 7. Conductividad en pulmón de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,001$. Diferencias significativas con el grupo control.

La permitividad de tejido pulmonar disminuye significativamente ($p < 0,05$) en los grupos tratados con cadmio y con mercurio respecto al control. Entre los dos grupos tratados con metales no existen diferencias significativas.

En pulmón la conductividad experimenta una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en los grupos tratados con cadmio y con mercurio respecto del control. Si comparamos los dos grupos tratados con metal, no aparecen diferencias significativas.

Páncreas

En las figuras 8 y 9 se representan respectivamente los valores medios de la permitividad y conductividad \pm DE en páncreas de ratas controles y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

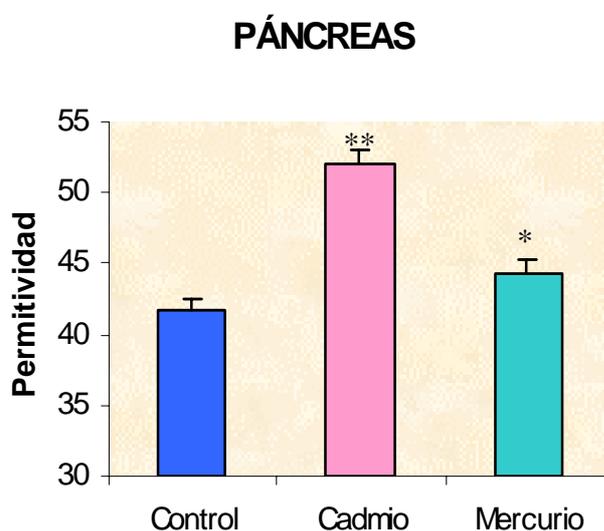


Figura 8. Permitividad en páncreas de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,01$. Diferencias significativas con el grupo control.

** $p < 0,001$. Diferencias extremadamente significativas con respecto al grupo control.

En la figura 8 se observa un incremento de la permitividad en páncreas en los dos grupos tratados con metal. Este aumento es extremadamente

significativo ($p < 0,001$) para el grupo tratado con cadmio y significativo ($p < 0,01$) para el grupo tratado con mercurio. Si comparamos el efecto de los dos metales se detecta un mayor aumento de la permitividad con el cadmio.

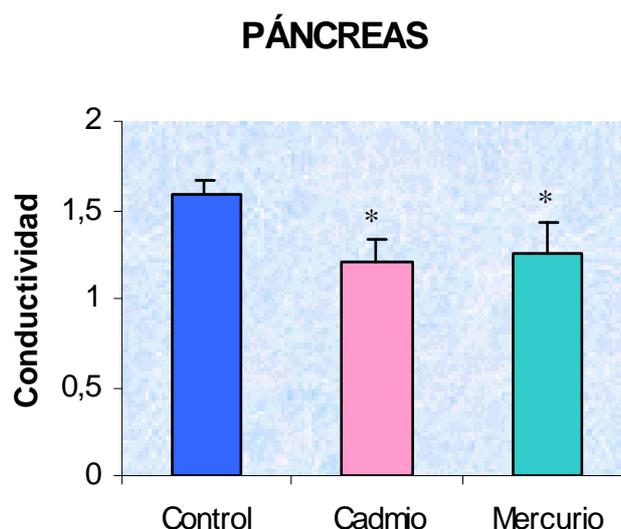


Figura 9. Conductividad en páncreas de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,001$. Diferencias significativas con el grupo control.

En páncreas, la conductividad experimenta una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en los grupos tratados con cadmio y con mercurio, respecto al control. Entre los dos grupos de metales no se producen diferencias significativas en la conductividad.

Músculo

En las figuras 10 y 11 se muestran respectivamente los valores medios de la permitividad y conductividad \pm DE en músculo de ratas control y tratadas con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

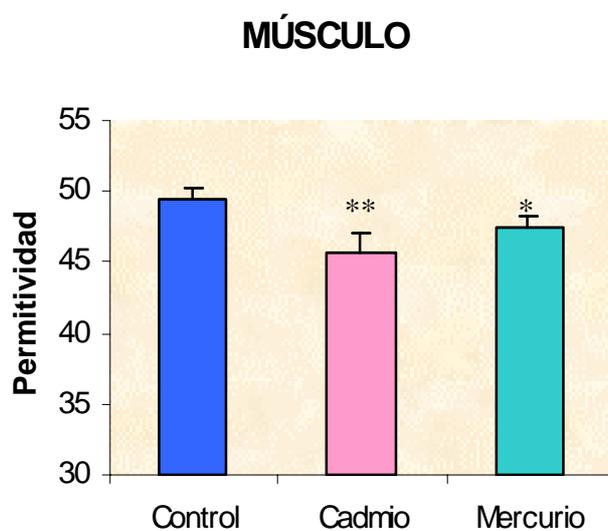


Figura 10. Permitividad en músculo de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y de mercurio.

* $p < 0,01$. Diferencias significativas con el grupo control.

** $p < 0,001$. Diferencias extremadamente significativas con respecto al grupo control.

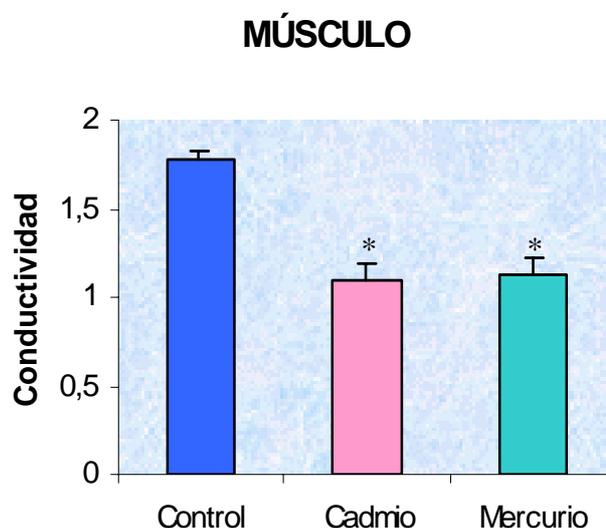


Figura 11. Conductividad en riñón de ratas control y tratadas con una sobrecarga de cadmio y mercurio respectivamente.

* $p < 0,001$. Diferencias significativas con el grupo control.

En músculo se observa una disminución de la permitividad en los grupos tratados con cadmio y con mercurio respecto del control, siendo extremadamente significativa para el cadmio ($p < 0,001$) y significativa para el mercurio ($p < 0,01$).

La conductividad en músculo muestra una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en los grupos tratados con cadmio y con mercurio respecto del control. Si comparamos los dos grupos tratados con metal no se detectan diferencias significativas en la conductividad.

Estudio comparativo del efecto de los dos metales en la permitividad y conductividad de los diferentes tejidos.

En las figuras 12 y 13 se presenta una correlación entre los valores de permitividad y conductividad de diferentes tejidos en el grupo control y en los grupos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

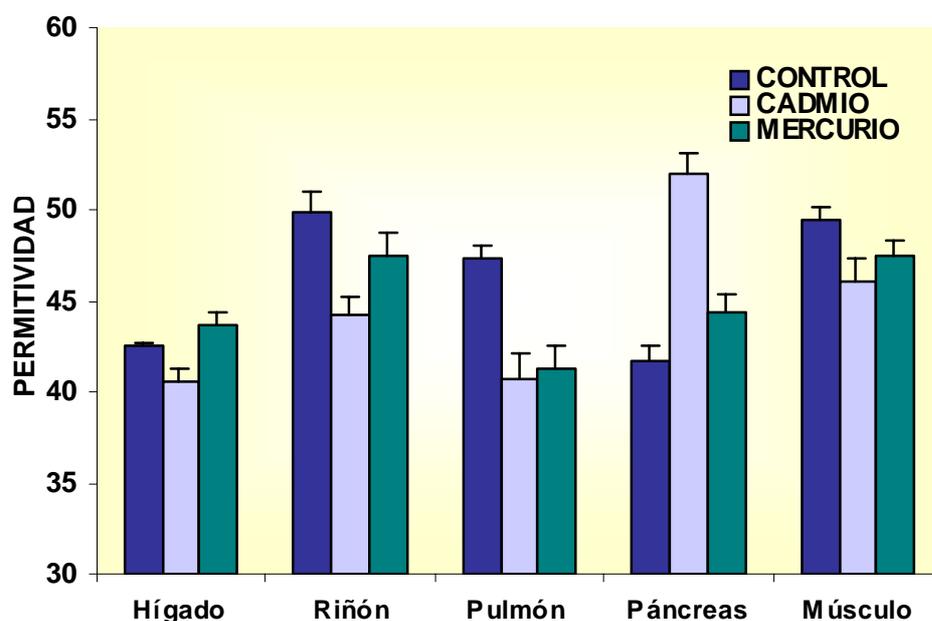


Figura 12. Permitividad en muestras biológicas de ratas control y tratadas con cadmio y con mercurio.

En la figura 12 se observa en el grupo tratado con cadmio con respecto al grupo control una disminución significativa de la permitividad en todos los órganos excepto en páncreas donde se produce un aumento muy significativo ($p < 0,001$) comparado con el control.

En el caso del tratamiento con mercurio se detecta una disminución significativa de la permitividad en riñón, pulmón, músculo si lo comparamos

con el grupo control, sin embargo en hígado y páncreas se produce un aumento de la permitividad.

Si comparamos los dos grupos tratados con metal, no se observan cambios significativos en la permitividad en pulmón y músculo. Sin embargo en hígado y riñón el efecto del mercurio es mayor que el del cadmio y en páncreas se detecta un mayor valor de la permitividad para el cadmio.

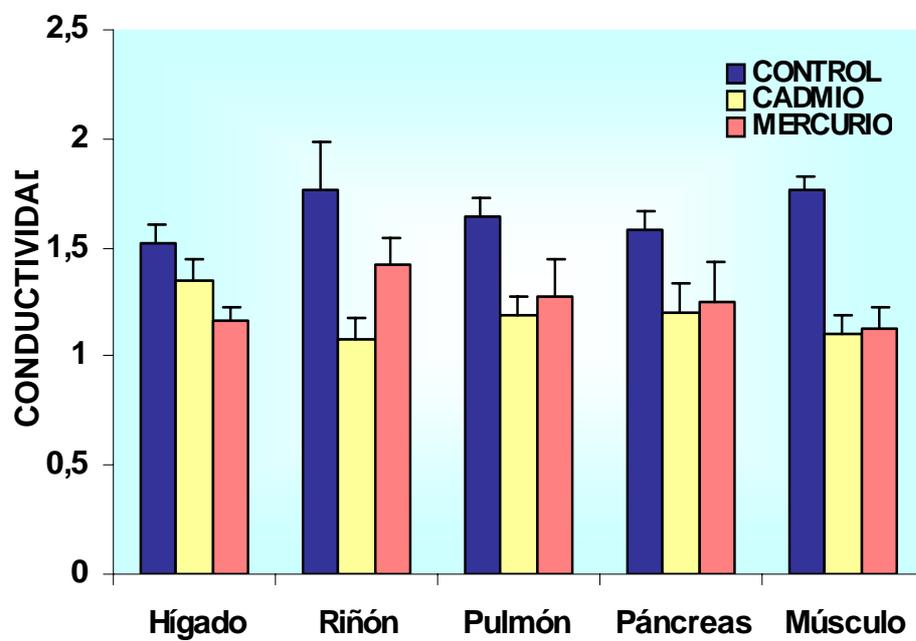


Figura 13. Conductividad en muestras biológicas de ratas control y tratadas con cadmio y con mercurio.

En la figura 13 tenemos una correlación de los valores de la conductividad para los diferentes tejidos en el grupo control y los grupos tratados con cadmio y con mercurio. Si tenemos en cuenta solamente el grupo control, todos los tejidos tienen valores similares de conductividad, no se observa ningún tejido que destaque, por tener una conductividad muy diferente de los demás. Esto también sucede en los grupos tratados con cadmio y con mercurio.

Se detecta una disminución de la conductividad en los grupos tratados con cadmio y con mercurio respecto del control que es muy significativa ($p < 0,001$) en todos los casos excepto para el hígado con sobrecarga de cadmio que la disminución con respecto al control es significativa ($p < 0,05$).

V.2.1.3. Determinación de la concentración de metal en cada tejido mediante ICP-MS.

Se analiza la concentración de metal en cada tejido en el grupo de ratas control y en los grupos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio, mediante la técnica de plasma de acoplamiento inductivo asociado a un espectrómetro de masas conocida como ICP-MS. Previamente se realiza una calibración del sistema.

Calibración del sistema

El análisis se lleva a cabo mediante la adición de un estándar externo para poder corregir mediante cálculos, cambios en la sensibilidad del detector. Se obtienen las gráficas de calibrado para las disoluciones estándar de plomo, mercurio, cadmio y hierro con los parámetros calculados en Excel (Figura 14).

Se añade una disolución estándar de rodio a cada muestra para obtener la concentración de 10 ppb.

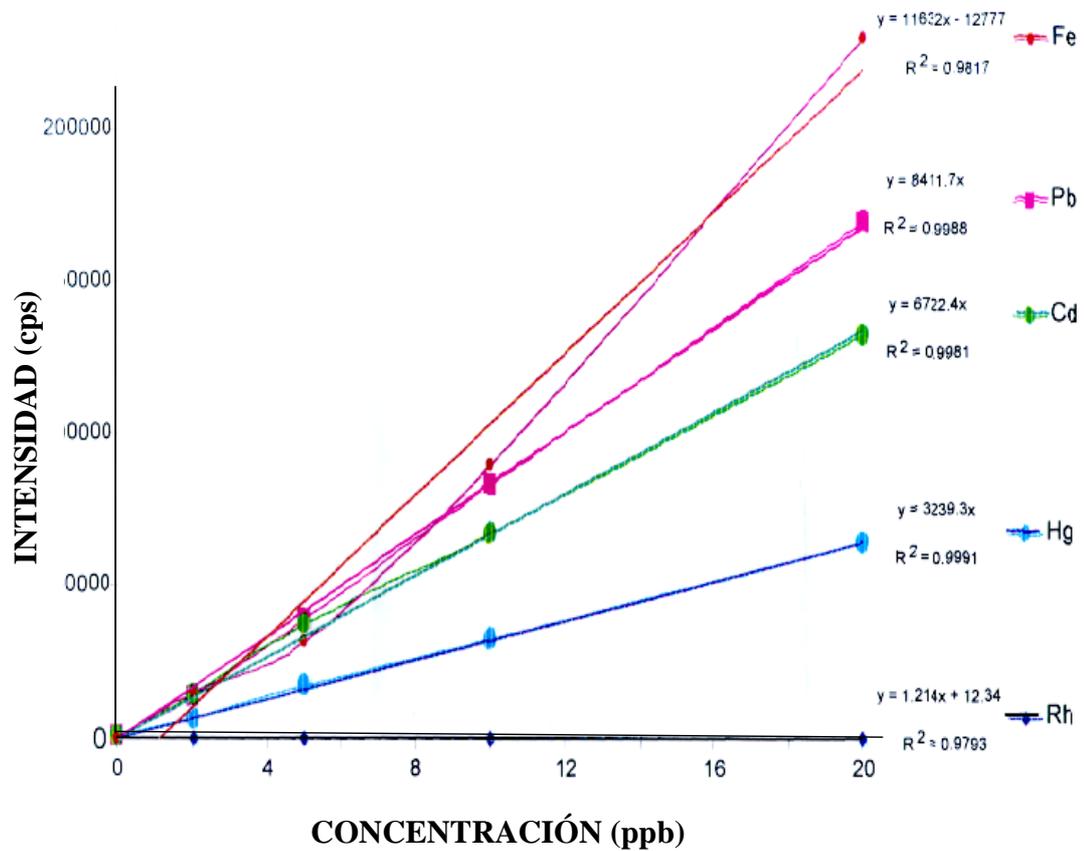


Figura 14. Gráfica de calibración para las disoluciones estándar de Cd, Hg, Pb y Fe.

La intensidad se mide en cuentas por segundo (cps).

La desviación estándar para los gráficos de calibración se muestra en la tabla 6.

<i>Elemento</i>	<i>Desviación Estándar</i>
Pb²⁰⁶	3,1%
Hg²⁰²	3,0%
Cd¹¹⁴	6,3%
Fe⁵⁶	13,2%

Tabla 6. Desviación estándar para las gráficas de calibración.

V.2.1.3.1. Análisis de la concentración de cadmio

En primer lugar se determina la concentración de cadmio expresada en ppm en hígado, riñón, músculo, páncreas y pulmón, en el grupo control y en el grupo tratado con sobrecarga de cadmio (Figura 15).

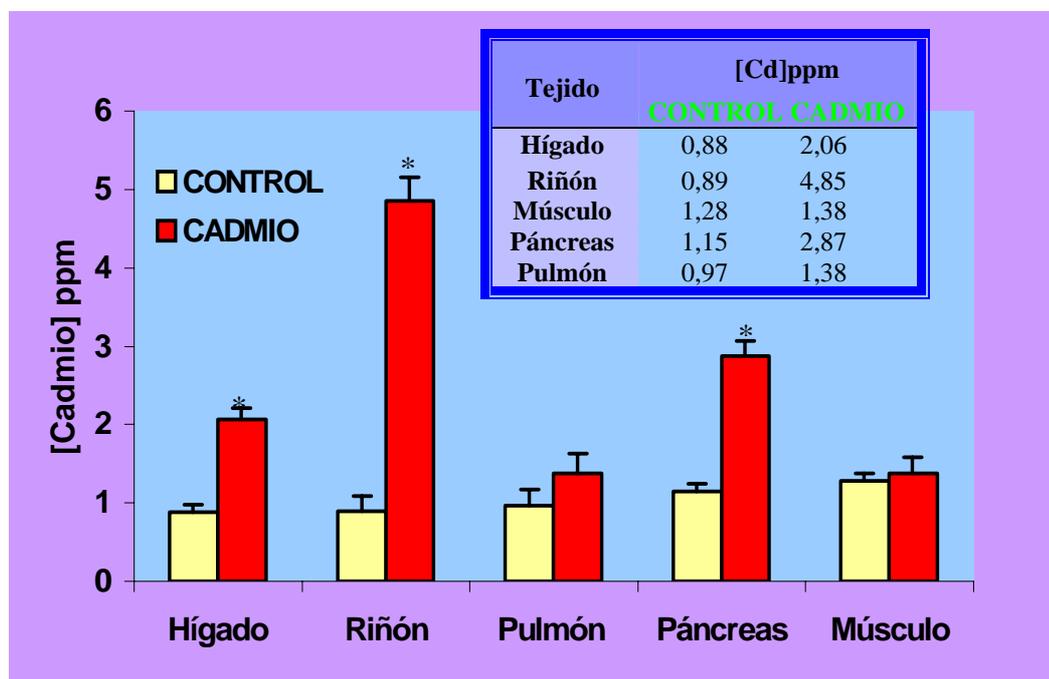


Figura 15. Concentración de cadmio en ppm \pm DE en el grupo de ratas control y en el tratado con sobrecarga de cadmio.

$p < 0,05$. Diferencias significativas con el grupo control.

En el grupo control no se producen diferencias significativas en la concentración de cadmio en ningún órgano. Sin embargo en el grupo tratado se observa una mayor concentración de cadmio en riñón, páncreas e hígado.

En la figura 15 se detecta un aumento significativo de la concentración de cadmio en riñón, hígado y páncreas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

En pulmón y tejido muscular no se observan diferencias significativas en la concentración de cadmio entre el grupo tratado con cadmio y el grupo control.

Se puede concluir del análisis de ICP-MS realizado, que el tratamiento con cadmio en ratas produce acumulación de iones Cd^{2+} en hígado, páncreas y riñón siendo especialmente significativa en este último. En los tejidos como pulmón y músculo no se detecta acumulación significativa de metal.

V.2.1.3.2. Análisis de la concentración de mercurio

A continuación se representa la concentración de mercurio expresada en ppm en varios tejidos de rata control y tratados con sobrecarga de mercurio (Figura 16).

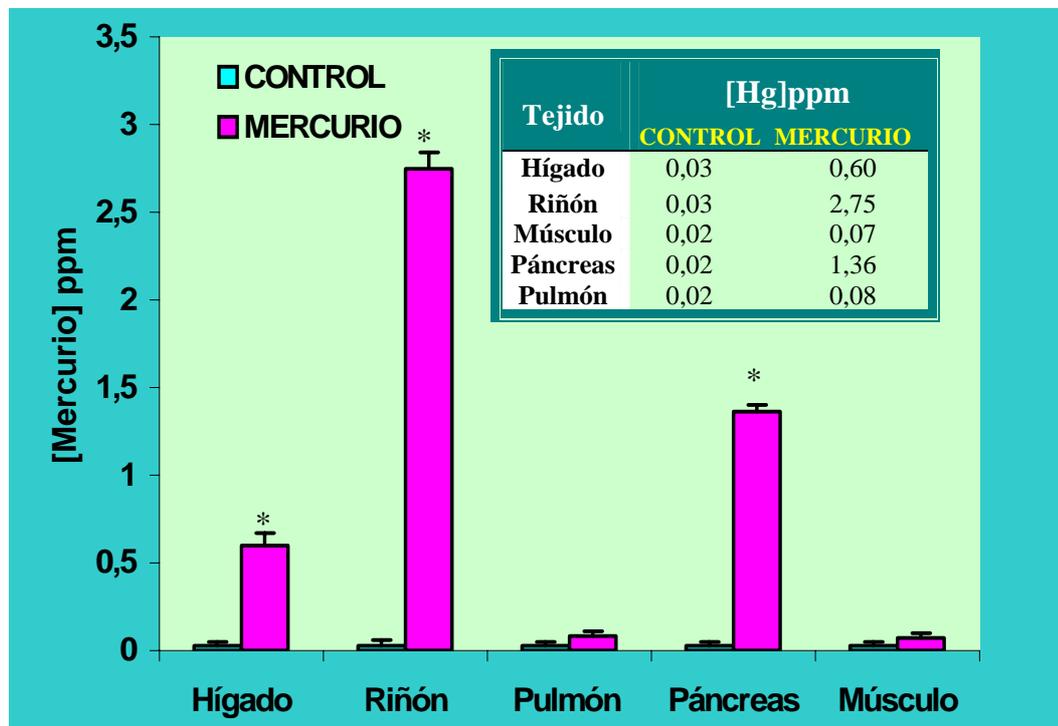


Figura 16. Concentración de mercurio en ppm \pm DE en el grupo de ratas control y en el tratado sobrecarga de mercurio.

* $p < 0,05$. Diferencias significativas con el grupo control.

En el grupo control no se detectan diferencias significativas en la concentración de mercurio en ningún órgano. Sin embargo en el grupo tratado se observa una mayor concentración de mercurio en riñón, páncreas e hígado. La concentración de mercurio en riñón es superior a la de páncreas ($p < 0,05$) y ésta superior a la de hígado ($p < 0,05$).

En la figura 16 se produce un incremento significativo ($p < 0,05$) de la concentración de mercurio en riñón, páncreas e hígado si la comparamos con el grupo control. En los demás tejidos: pulmón, y músculo, no aparecen diferencias significativas en la concentración de mercurio con respecto al grupo control

Mediante el análisis de ICP-MS se puede concluir que el tratamiento con mercurio en ratas provoca acumulación de iones Hg^{2+} en hígado, páncreas y sobre todo en riñón. En los tejidos como pulmón y músculo no se detecta acumulación significativa de mercurio.

VI. DISCUSIÓN

Actualmente existe una preocupación social por los posibles efectos sobre la salud humana relacionados con la exposición a campos electromagnéticos (CEM). El origen de esta inquietud nace de la publicación de algunos estudios epidemiológicos que asociaron la exposición a campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz), procedentes de líneas de alta tensión, con determinados tipos de leucemia y tumores cerebrales.

Esta preocupación se ha visto incrementada en los últimos años, debido a la masiva instalación de antenas de telefonía y el uso generalizado de teléfonos móviles, que operan con campos electromagnéticos en el rango de las radiofrecuencias (RF).

Los efectos potencialmente peligrosos para la salud de cualquier agente físico o químico, en este caso, los campos electromagnéticos, deben ser investigados desde dos diferentes puntos de vista: epidemiológico y experimental. Por un lado es necesario efectuar estudios epidemiológicos sobre poblaciones suficientemente amplias y expuestas claramente al agente y, por otra parte, la obtención de conclusiones fiables y seguras requiere que el

efecto observado en la epidemiología sea contrastado en el laboratorio mediante estudios experimentales rigurosos.

Algunos estudios epidemiológicos sugieren una relación entre la exposición a campos electromagnéticos y el incremento del riesgo de aparición de ciertas enfermedades relacionadas principalmente con cáncer, malformaciones congénitas, trastornos del sistema nervioso, inmune, oftálmico y epidérmico. Pero examinados en conjunto estos estudios no aportan pruebas concluyentes o definitivas y sí resultados contradictorios. Las posibles razones podrían ser la dificultad de establecer una relación directa dosis-respuesta, la falta de precisión para caracterizar la exposición a los CEM, la variabilidad estadística inherente a este tipo de estudios que dificulta su interpretación, e incluso la presencia de errores sistemáticos en su diseño o en su análisis.

A diferencia de los estudios epidemiológicos dirigidos a estimar el riesgo para la salud derivado de una exposición laboral o doméstica, el objetivo de los estudios experimentales de laboratorio es provocar intencionadamente unos efectos, exponiendo de forma controlada células, tejidos o animales a los campos electromagnéticos; y posteriormente tratar de analizar los posibles mecanismos por los cuales se producen estos efectos. Los datos experimentales sobre los efectos de los campos magnéticos de

frecuencia industrial (50 Hz) engloban diversos ámbitos de análisis, entre los que destacan los relacionados con el cáncer (genotoxicidad y potencial cancerígeno), el sistema inmune, el sistema endocrino, las alteraciones de la conducta y del sistema nervioso central, el estrés y el sistema cardiovascular; también se han realizado trabajos sobre los efectos en la reproducción y el desarrollo embrionario. En general, de todas estos estudios se han obtenido resultados diversos y a veces contradictorios, por esta razón, en la comunidad científica existe un acuerdo generalizado sobre la necesidad de proseguir las investigaciones relativas a los CEM.

En la presente memoria abordamos el estudio de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (CM-MBF) de 50Hz mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*. Por un lado, realizamos estudios *in vitro* con linfocitos humanos de sangre periférica para intentar evaluar el posible efecto genotóxico y el efecto sobre la proliferación celular de los campos magnéticos de 50Hz, relacionándolo a su vez con los tóxicos ambientales cadmio y mercurio. También exponemos sangre total humana *in vitro* a campos magnéticos (CM) de 50 Hz para determinar los posibles efectos sobre los parámetros bioquímicos y enzimáticos séricos.

Por otro lado, presentamos estudios *in vivo* con ratones expuestos a campos magnéticos de 50 Hz y ratones tratados con sobrecarga de un metal

neurotóxico: mercurio, para investigar ambos efectos sobre un sistema concreto: la barrera hematoencefálica y estudiar el posible efecto sinérgico entre los CM y el mercurio en la permeabilidad de la misma.

En esta memoria también nos centramos en los campos electromagnéticos de radiofrecuencia, de forma que exponemos varios tejidos de rata *in vitro* a campos electromagnéticos de RF concretamente 2,45 GHz después de someter a diferentes grupos de animales a un tratamiento con sobrecarga de cadmio y de mercurio para obtener información sobre las propiedades eléctricas de los tejidos (permitividad y conductividad). Ambos elementos se han escogido por su frecuente polución ambiental, y por la existencia de diversas patologías derivadas de la tesarismosis de iones metálicos. Estos experimentos se han realizado en colaboración con el Departamento de Física Aplicada III, de la Facultad de Física de la Universidad Complutense de Madrid.

VI.1. CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz) Y SU POSIBLE SINERGISMO CON METALES PESADOS: CADMIO, MERCURIO EN CULTIVOS CELULARES DE LINFOCITOS HUMANOS.

En la literatura científica se citan algunos estudios epidemiológicos que sugieren una relación entre cáncer y la exposición a campos magnéticos de 50 Hz (Wertheimer y Leeper 1979, Savitz y col. 1988, Feychting y col. 1993, Ahlbom 1997), sin embargo otros trabajos dejan esta hipótesis en entredicho (Kolodinsky y col. 1996, Linet y col 1997, Angelillo y col. 1999). En general estos estudios sobre efectos cancerígenos de los campos magnéticos de 50 Hz han proporcionado resultados contradictorios. Los resultados experimentales sobre los efectos genotóxicos de los campos magnéticos de 50 Hz tampoco aportan datos concluyentes.

Con objeto de continuar la investigación sobre los campos magnéticos de 50 Hz, en la presente memoria se pretende determinar si estos campos tienen capacidad genotóxica evaluando su capacidad para inducir micronúcleos. En este trabajo también se combina el efecto del campo magnético con el de los metales pesados cadmio y mercurio, presentes en el medio ambiente debido a las actividades industriales.

Las células elegidas para realizar este experimento son linfocitos de sangre periférica humana por ser unos indicadores muy sensibles del daño cromosómico inducido tanto *in vivo* como *in vitro*.

En primer lugar establecemos el tiempo correcto de incubación de los linfocitos a 37°C y la concentración óptima de fitohemaglutinina para el crecimiento de estas células. Se añade un precursor (nucleótido del DNA) marcado radiactivamente, en concreto, timidina tritiada al cultivo celular de forma que las células en división lo incorporan a su DNA, cuantificándose posteriormente el marcaje del material genético.

Después del contaje de la timidina tritiada conseguimos establecer el tiempo correcto de incubación (96 horas) y la concentración óptima de fitohemaglutinina (10 µg/mL) para posteriormente realizar el contaje de células binucleadas y micronúcleos y así evaluar los posibles efectos genotóxicos de un agente físico (campos magnéticos de muy baja frecuencia: CM-MBF) y agentes químicos (metales pesados: cadmio y mercurio).

En la presente investigación se estudia el efecto sobre la inducción de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica humana sometidos a campos magnéticos de muy baja frecuencia, 50 Hz a diferentes intensidades (0,5 A, 1 A, 1,5 A) durante 96 horas. Estos estudios se han realizado, siguiendo las recomendaciones del Parlamento Europeo (DOCE N° 205/440 Documento N° A3-0238/94, 1994), en presencia de metales pesados, para determinar si estos agentes químicos frecuentes en el medio potencian o no el efecto del campo magnético. Los metales pesados utilizados en el ensayo,

cadmio y mercurio son agentes químicos medioambientales bien conocidos con unos efectos tóxicos muy marcados (García-Arribas y col. 1998).

Si nos centramos en el efecto del metal solamente, se observa un efecto genotóxico a las concentraciones de cadmio de 10^{-4} M a 10^{-6} M, produciéndose un aumento significativo ($p < 0,05$) del número de micronúcleos respecto al control. Además el número de micronúcleos es dosis-dependiente, a mayor concentración de cadmio, mayor número de micronúcleos. A la concentración de cadmio 10^{-7} M no se producen cambios significativos en el número de micronúcleos respecto al control. Es conocido que el cadmio produce una acción directa genotóxica, se intercala entre las hebras de DNA, inhibe la DNA polimerasa y provoca roturas en las hebras de DNA, también interviene en el mecanismo de reparación del DNA por rotura de las nucleasas (Privezentsev y col. 1996, Calevro y col. 1998). Además induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden producir daño oxidativo en el DNA (Dally y col. 1997).

En el caso del mercurio se detecta un aumento significativo ($p < 0,05$) del número de micronúcleos respecto al control a las concentraciones de 10^{-4} M y 10^{-5} M, que puede ser debido a que este ión induce la formación de ROS que pueden provocar lesiones en el DNA (Hussain y col. 1999, Schurz y col. 2000).

Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que encontraron un aumento del número de micronúcleos dependiente de la dosis al tratar linfocitos humanos de sangre periférica con cadmio o con mercurio. En concreto, Anwar y col. (1991) y Al Sabti y col. (1992), observaron un aumento del número de micronúcleos en linfocitos de trabajadores expuestos laboralmente a mercurio. Franchi y col. (1994) también encontraron un aumento del número de micronúcleos en linfocitos de pescadores que se alimentaban con marisco contaminado con mercurio. En un estudio reciente Fu y col. (1999), detectaron un aumento de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en linfocitos de personas expuestas a cadmio medioambiental durante 30 años.

Otros autores como Berces y col. (1993) trataron sangre humana total con CdCl_2 y HgCl_2 a diferentes concentraciones observando un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los linfocitos tratados con Cd y Hg. Los resultados obtenidos por estos autores indican que los iones Cd^{2+} incrementan la frecuencia de micronúcleos significativamente a las concentraciones de 10^{-4}M - 10^{-6}M ; Ogura y col. (1996), encontraron un aumento del número de micronúcleos en linfocitos humanos tratados con HgCl_2 , siendo la concentración de 10^{-5}M la que producía un mayor número de micronúcleos respecto al control; coincidiendo así nuestros resultados con los de los autores señalados.

En la literatura científica existen estudios citogenéticos que emplean otros tipos celulares expuestos a CdCl_2 *in vitro*: fibroblastos humanos (Bonatti y col. 1992), células HeLa humanas (Dally y col. 1997), células de bazo de ratón (Fahmy y col. 2000). Los experimentos *in vivo* se han realizado sometiendo ratones a tratamiento con CdCl_2 , estudiándose posteriormente los eritrocitos de la médula ósea (Han y col. 1992, Jagetia y col. 1994, Marrazzini y col. 1994, Privezentsev 1996, Fahmy y col. 2000). En todos los estudios anteriores se observó un aumento del número de micronúcleos.

Una vez estudiado el efecto de los metales pesados, evaluamos el efecto de los CM-MBF. Los campos magnéticos que utilizamos son de 50 Hz y diversas intensidades 0,5 Amperios (A), 1 A y 1,5 A. Presentamos una equivalencia de unidades entre amperios (A) y militeslas (mT) ya que en la mayoría de los trabajos revisados de la literatura, la intensidad de campo magnético viene expresada en militesla. En concreto, 0,5 A equivalen a 3,2 mT, 1 A equivalen a 6,5 mT y 1,5 A equivalen a 9,7 mT.

Nuestros resultados indican que la exposición de linfocitos humanos de sangre periférica a CM de frecuencia 50 Hz y diferentes intensidades 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT), 1,5 A (9,7 mT) no afecta al número de micronúcleos. No se han encontrado por tanto efecto genotóxico después de la aplicación de los CM de 50 Hz a las diferentes intensidades aplicadas.

Tampoco se observa efecto sinérgico entre los metales estudiados (cadmio y mercurio) y el campo magnético. En los grupos tratados con metal cuya concentración varía de 10^{-4} M- 10^{-7} M no se detectan cambios significativos en el número de micronúcleos a ninguna intensidad de campo magnético aplicado.

Estos resultados coinciden con aquellos publicados por otros autores que tampoco encontraron efectos genotóxicos en linfocitos humanos después de la exposición a campos magnéticos de 50 o 60 Hz y a varias intensidades. En estos estudios los ensayos citogenéticos empleados fueron: test de aberraciones cromosómicas (AC), test de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y ensayo de micronúcleos. En concreto, Cohen y col. (1986a, 1986b) no encontraron efectos genotóxicos en linfocitos periféricos sometidos a CM-MBF 60 Hz mediante el test de AC y el test de ICH. Rosenthal y Obe (1989) sometieron linfocitos humanos periféricos a un CM-MBF 50 Hz y 5 mT, no observándose efecto genotóxico mediante el test de ICH. El resultado negativo de Rosenthal y Obe fue confirmado por Antonopoulus y col. (1995) utilizando también linfocitos humanos sometidos a CM de 50 Hz y 5mT. Sagredo y col. (1990) tampoco detectaron efectos genotóxicos después de la exposición a CM-MBF e intensidades que oscilan entre 25-300 μ T, utilizando las técnicas de AC, ICH y ensayo de micronúcleos. Hintenlang (1993) empleando también linfocitos humanos periféricos y un CM de 50Hz e intensidades entre 0,6-1,4 mT no encontró efectos genotóxicos mediante el

ensayo de micronúcleos. En un estudio realizado por Paile y col. (1995) no se observaron cambios en la frecuencia de micronúcleos de linfocitos humanos periféricos expuestos a CM de 50 Hz y a las intensidades de 30 μ T-1 mT. Este estudio fue confirmado por Scarfi y col. (1999) empleando linfocitos humanos y un CM con las mismas intensidades. Otros autores no detectaron diferencias en la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica de trabajadores de líneas de alta tensión sometidos a CM de 50 Hz y 5-10 μ T (Valjus y col. 1993, Skyberg y col. 1993).

Sin embargo la extrapolación de estos resultados debe tomarse con precaución ya que existe un número de estudios donde los efectos biológicos de los campos magnéticos solo ocurren en presencia de frecuencias o intensidades específicas, estos son los llamados efectos ventana (Chiabrera y col. 1994). Los efectos ventana se han observado para los efectos genotóxicos. En concreto Tofani y col. (1995) expusieron linfocitos humanos periféricos a 32 Hz observando un aumento del número de micronúcleos, sin embargo en un estudio posterior empleando un CM de 50Hz no se encontró ningún efecto genotóxico. Además también existen otros estudios en los que se ha observado efecto genotóxico en linfocitos humanos sometidos a campos de 50 Hz, aunque no se han podido reproducir (Nordenson y col. 1984 y Khalil y col. 1991).

En la presente memoria se estudia el efecto de los CM de 50 Hz, por ser la frecuencia europea, a diversas intensidades 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT) y 1,5 A (9,7 mT) sobre la proliferación celular de linfocitos humanos de sangre periférica incubados durante 96 h. También se estudia el efecto combinado de estos CM y cada uno de los metales pesados, cadmio y mercurio sobre la proliferación celular.

Primero investigamos el efecto de los metales pesados sobre la proliferación celular; el mecanismo por el cual los metales pesados producen daño celular depende del tipo de metal, su distribución subcelular y la concentración de metal en la exposición.

En los grupos tratados con metales pesados cadmio y mercurio tanto sin exponer a campo magnético como los expuestos a campos magnéticos de 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT) y 1,5 A (9,7 mT) se observa que la concentración de metal de 10^{-3} M es muy tóxica para las células, a esta concentración la proliferación celular es muy similar al blanco, además en el anterior ensayo de micronúcleos, con esta concentración tampoco se observaron linfocitos binucleados suficientes para realizar el experimento. Los iones metálicos a concentraciones elevadas como es el caso de 10^{-3} M, pueden producir durante su transporte al interior de la célula rotura de la membrana celular, provocando una pérdida de su regulación homeostática, trastorno grave del metabolismo energético y muerte celular. Este resultado coincide

con el experimento anterior, ya que a la concentración de metal de 10^{-3} M no se observan linfocitos binucleados suficientes para poder realizar el experimento porque se trata de una concentración tóxica para las células en cultivo.

Si comparamos los linfocitos sin tratar con los tratados con diferentes concentraciones de iones cadmio y de mercurio, se observa tanto en el grupo (control) sin exponer a campo magnético como en los expuestos a campos magnéticos de diferentes intensidades, una disminución de la proliferación celular a medida que aumenta la concentración de metal siendo significativa ($p < 0,05$) para la concentración de metal $\geq 10^{-5}$ M. Para las concentraciones de cadmio o mercurio de 10^{-6} M y 10^{-7} M no se detectan cambios significativos en la proliferación celular con respecto al grupo sin tratamiento químico.

Si nos centramos en el efecto de los CM de 50 Hz y diferentes intensidades sobre linfocitos sin ningún tratamiento químico, no se observan cambios significativos en la proliferación celular a las intensidades de 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT). Con la intensidad de 1,5 A (9,7 mT) se produce una disminución significativa de la proliferación celular debido a un aumento de temperatura $> 37^{\circ}\text{C}$ en los cultivos celulares expuestos a CM-MBF, mientras que los controles, ausentes de CM, mantienen su temperatura constante, es

decir con 1,5 A (9,7 mT) disminuye la proliferación celular por causa no del CM-MBF en sí mismo sino, por un factor extrínseco, la temperatura.

Hemos comprobado que nuestro sistema de generación de CM-MBF de 50 Hz solo es útil para trabajar con intensidades de campo electromagnético de 0 - 1 A (6,5 mT), porque para intensidades mayores, aumenta la temperatura de forma que se produce una disminución de la viabilidad de los linfocitos en los cultivos celulares. Por esta razón, en posteriores experimentos que se han realizado con sangre humana sometida a campos magnéticos de 50 Hz en este sistema, no se ha empleado la intensidad de 1,5 A (9,7 mT), sino un rango de intensidades de campo magnético que varía de 0 - 1 A (6,5 mT).

Si analizamos el efecto combinado del campo magnético con el metal pesado, se obtiene que, a la intensidad de CM de 0,5 A (3,2 mT) no se observan cambios significativos entre el grupo no expuesto y el grupo expuesto a campo magnético a ninguna de las concentraciones de cadmio o mercurio utilizadas. Con la intensidad de campo magnético de 1 A (6,5 mT) se produce un aumento de la proliferación celular en el grupo expuesto a campos magnéticos respecto al grupo no expuesto, a todas las concentraciones de cadmio y de mercurio, pero no es significativo. En cuanto a la intensidad de 1,5 A (9,7 mT), se observa una disminución significativa de la

proliferación celular en el grupo expuesto respecto al control, no expuesto a las concentraciones de metal $\geq 10^{-4}$ M, debido como se ha comentado anteriormente a un aumento de temperatura en los cultivos expuestos a campos magnéticos de 1,5 A (9,7 mT).

En la proliferación celular no se ha detectado efecto sinérgico entre el metal (cadmio, mercurio) y el campo magnético de 50 Hz aplicado a ninguna de las intensidades utilizadas. Los metales no potencian la acción del CM de 50 Hz, al aumentar la concentración de metal no se observa un mayor efecto del campo magnético en la proliferación celular.

Hay muy pocos estudios sobre la proliferación de células humanas *in vitro* bajo la exposición de CM-MBF 50 Hz. Los resultados del presente trabajo coinciden con los de otros autores que no encuentran efectos en la proliferación celular utilizando linfocitos, y otros tipos celulares diferentes. En concreto, Cleary y col. (1990), no observaron efectos en la morfología y viabilidad de linfocitos humanos expuestos *in vitro* a CEM de 2,45 MHz. Paile y col. (1995) tampoco detectaron diferencias en la proliferación de linfocitos humanos expuestos a 50 Hz y 30 μ T-1mT usando el índice de división nuclear. Thun-Battersby y col. (1999) no obtuvieron efectos sobre la proliferación celular de linfocitos pertenecientes a ratas expuestas a CM-MBF 50 Hz y 0,1 mT. Otros estudios han utilizado diversos tipos celulares para

estudiar la proliferación celular. En concreto, Cridland y col. (1996) utilizaron fibroblastos humanos expuestos a CM-MBF 50 Hz y una intensidad de 20 μ T a 20 mT; Nakajima y col. 1997 emplearon fibroblastos humanos sometidos a CM-MBF 60 Hz; Nafziger y col. (1997) utilizaron células progenitoras hematopoyéticas humanas expuestas a CM 50 Hz entre 10 μ T a 1 mT y Simko y col. (1999) emplearon células de líquido amniótico humano sometidas a 50 Hz y 1 mT. En ninguno de estos estudios se observaron cambios en la proliferación celular.

Sin embargo en la literatura científica existen otros trabajos en los que se produce aumento de la proliferación celular utilizando campos magnéticos de frecuencia 50 Hz; los sistemas celulares utilizados fueron linfocitos (Cossariza y col. 1989, Scarfi y col. 1999), fibroblastos humanos (Kwee y col. 1995) y células epiteliales humanas (Mevissen y col. 1999). Otros autores sin embargo observaron una disminución de la proliferación celular y un aumento de la diferenciación de fibroblastos humanos sometidos a 20 Hz 7mT (Loschinger y col. 1998).

Como conclusión podríamos decir que en la presente investigación los campos magnéticos de muy baja frecuencia 50 Hz, e intensidades de 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT) y 1,5 A (9,7 mT) no afectan a la frecuencia espontánea de micronúcleos por tanto, no producen efectos genotóxicos en

linfocitos humanos expuestos durante 96 h. Tampoco afectan a la proliferación celular los campos magnéticos de 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT) sin embargo a la intensidad de 1,5 A (9,7 mT) disminuye la proliferación celular por causa de la temperatura. Si analizamos el efecto combinado de cada uno de los metales y el campo magnético se observa que tanto en el ensayo de micronúcleos como en el de proliferación celular al aumentar la dosis de cadmio o mercurio no se produce un mayor efecto del campo magnético sobre la generación de micronúcleos o sobre la proliferación celular. Por tanto no se ha encontrado un efecto sinérgico entre el metal (cadmio o mercurio) y el campo magnético de 50 Hz a ninguna de las intensidades estudiadas.

En el presente trabajo como se ha comentado anteriormente, no se observan efectos genotóxicos ni tampoco en la proliferación celular al aplicar campos magnéticos de muy baja frecuencia 50 Hz, estos resultados están en concordancia con los de otros autores que intentan explicar el mecanismo de interacción de los campos magnéticos con los sistemas biológicos. Según estos autores, los campos magnéticos de muy baja frecuencia inducen campos eléctricos dentro del cuerpo que ejercen fuerzas sobre las moléculas cargadas e iones siendo considerablemente más pequeñas que las fuerzas típicas intra e intermoleculares (Valberg 1995, Valberg y col. 1997).

Los autores mencionados intentan explicar los mecanismos por los cuales los campos magnéticos pueden interaccionar con los organismos vivos. Las interacciones de los campos eléctricos y magnéticos con la materia están gobernados por leyes físicas precisas y exhaustivamente comprobadas, sin ninguna excepción conocida en biología y medicina.

Para que los campos magnéticos ejerzan una influencia en las células vivas, deben actuar sobre el organismo de forma que se modifiquen las moléculas o estructuras.

Las magnitudes de las fuerzas endógenas que actúan a nivel celular para modificar las estructuras de las proteínas son conocidas y pueden servir de base para la comparación con las fuerzas producidas por los campos electromagnéticos. Se define una unidad de medida para las fuerzas muy pequeñas que es el piconewton (pN).

Algunas fuerzas operativas a nivel molecular y celular en los sistemas vivos son por ejemplo: fuerza de una molécula de quinesina necesaria para el movimiento intracelular: 3 pN (Svoboda y col. 1994), fuerza de una molécula de actina implicada en el movimiento muscular: 4 pN, (Finer y col. 1994), fuerza implicada en un canal iónico mecano-receptivo fundamental para la sensación de tacto: 12 pN (Sachs 1989), fuerza necesaria para alargar una molécula de DNA: 20 pN (Yin y col. 1995) y la fuerza necesaria para unir las dos hebras de DNA: 70 pN (Lee y col. 1994).

Se van a comparar estos valores con las fuerzas que los campos magnéticos pueden ejercer sobre las moléculas cargadas y los iones que las rodean. Por ejemplo si se considera un campo eléctrico externo de 60 Hz y 1000 V/m. Este campo se atenúa dentro del medioambiente conductivo del cuerpo transformándose en 0,1mV/m. Dentro del ambiente lipídico (aislante) de la membrana celular, el campo eléctrico puede incrementarse hasta 0,3 V/m. Para estimar un límite superior de la fuerza eléctrica, consideramos una proteína que tiene 100 cargas en exceso, la máxima fuerza sobre esta molécula es $5 \cdot 10^{-6}$ pN, que si comparamos con las fuerzas anteriores, aquellas son 50.000 veces más pequeñas que las fuerzas necesarias para modificar la estructura y función de una proteína. Si consideramos un CM de 50 Hz y 100 μ T podemos calcular el campo eléctrico inducido en una persona que es 5mV/m, que en las membranas celulares se amplifica a 15 V/m. En este caso la fuerza del campo eléctrico inducido sobre una proteína de la membrana celular de 100 cargas es $2,4 \cdot 10^{-4}$ pN, que es 500 veces más pequeña que las fuerzas típicas en las moléculas biológicas.

Se puede concluir por tanto que los campos magnéticos de muy baja frecuencia inducen campos eléctricos dentro del cuerpo que ejercen fuerzas sobre las cargas eléctricas siendo considerablemente más pequeñas que las fuerzas típicas intra e intermoleculares.

VI.2. EFECTOS DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz) EN SANGRE HUMANA A DIFERENTES TIEMPOS DE EXPOSICIÓN.

Se han evaluado los posibles efectos de los campos magnéticos (CM) de 50 Hz a distintas intensidades 0,25 A (1,6 mT), 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT) en sangre humana, determinándose diversos parámetros enzimáticos y bioquímicos en suero sanguíneo a diferentes tiempos de exposición.

En los parámetros bioquímicos analizados: proteínas totales, glucosa, urea, calcio, fósforo y hierro no se observaron cambios significativos a ninguna intensidad de campo magnético con respecto al suero control, por ello se ha estudiado a modo de ejemplo la evolución de dos parámetros: proteínas totales y fósforo.

En cuanto a los parámetros enzimáticos: LDH, CPK, FA, GPT y GGT, no se detectaron cambios significativos con respecto al control a ninguna intensidad de campo magnético, por ello se mostró en los resultados de forma representativa la evolución de la actividad enzimática de la LDH bajo la influencia de los campos magnéticos.

En los resultados obtenidos no se encuentran cambios significativos en la concentración de proteínas totales de la sangre expuesta a campos magnéticos a las intensidades de 0,25 A (1,6 mT), 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT) en comparación con el grupo control sin exposición. Tampoco se detectan cambios significativos en la concentración de proteínas totales a diferentes horas de exposición tanto en el grupo control como en los grupos expuestos a diferentes intensidades de campo magnético. Las proteínas totales se mantienen prácticamente constantes independientemente de las horas de exposición.

En lo referente al fósforo, se observa una tendencia general a aumentar la concentración de fósforo a medida que aumenta el tiempo de incubación, tanto en el grupo control como en los grupos expuestos a CM, es decir el incremento es independiente de la presencia de campos magnéticos.

A las 12 h de incubación se produce un aumento de la concentración de fósforo con respecto a las 0 h bajo la exposición a campos magnéticos de 0,5 y 1 A, pero no es significativo. Tanto en el grupo control como en los grupos expuestos a campos magnéticos se detecta un aumento significativo de la concentración de fósforo a partir de las 12 h de incubación, puede ser debido a que si el tiempo de incubación es demasiado largo, se puede romper el equilibrio de la membrana celular de las células sanguíneas; la membrana que

antes era activa permitiendo un transporte activo de iones a ambos lados, ahora se vuelve semipermeable ya que se suprimen las relaciones de equilibrio de los iones de forma que los iones fósforo salen al medio extracelular aumentando su concentración en el suero. Otras fuentes de fósforo en el suero son los fosfolípidos de membrana que se pueden dañar, liberando fósforo al medio extracelular y la molécula de ATP también puede disociarse liberando ADP y P.

Si comparamos el grupo control con los grupos expuestos a campo magnético, se observa un aumento de la concentración de fósforo a partir de las 12 h de exposición a medida que aumenta la dosis de campo magnético de 0,25 A (1,5 mT) a 1 A (6,5 mT), obteniéndose los valores máximos con 1 A (6,5 mT) de intensidad, pero este aumento no es significativo para ninguna de las intensidades de campo magnético estudiadas.

Los estudios realizados con la LDH indican que tanto en el grupo control como en los grupos expuestos a campo magnético hay una tendencia general al aumento de la actividad enzimática de la LDH a medida que aumenta el tiempo de exposición, y sobre todo se produce un aumento a las 48 h aunque no es significativo.

La LDH es una enzima intracelular, está dentro del hematíe, en este experimento hemos incubado sangre humana a 37°C y a diferentes tiempos de incubación, si éste es muy largo puede llegar a afectar a las células de forma que se rompe el equilibrio de la membrana celular, produciéndose daño celular y pérdida de la integridad estructural de los hematíes, como consecuencia, la LDH se libera al medio extracelular, aumentando su concentración en suero, aunque no de forma significativa porque la concentración de la enzima en las células es muy pequeña.

Si comparamos el grupo control con el grupo tratado con campos magnéticos a 0,25 A de intensidad, no se detectan diferencias significativas a ningún tiempo de exposición. En los grupos tratados con 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT) se produce un aumento de la actividad enzimática de la LDH con respecto al grupo control a partir de las 6 h, pero no es significativo en ninguno de los dos casos. Por lo tanto no se observan cambios significativos en la actividad de la LDH a ninguna intensidad de campo magnético con respecto al control.

Como conclusión se puede decir que la exposición de sangre humana a campos magnéticos de 50 Hz a las intensidades de 0,25 A (1,6 mT), 0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT) y diferentes tiempos de exposición desde el inicio hasta 48 horas no produce cambios significativos en las concentraciones de proteínas

totales, fósforo, glucosa, urea, calcio, hierro y tampoco en las actividades enzimáticas de LDH, CPK, FA, GPT y GGT a ninguna intensidad de campo magnético utilizada, y a ningún tiempo de incubación estudiado.

Estos resultados están en consonancia con el hecho de que, los campos magnéticos de 50 Hz, si bien pueden inducir corrientes eléctricas en los tejidos, no tienen suficiente energía para romper los enlaces covalentes entre las moléculas biológicas, ni siquiera el enlace de hidrógeno que es el más débil; como ya se ha comentado ampliamente en el experimento anterior.

En la literatura científica no existen estudios previos sobre los efectos de los campos magnéticos de 50 Hz en sangre humana *in vitro*. Sin embargo existe un buen número de trabajos en los que se estudia la aplicación de los campos magnéticos de 50 Hz a diferentes sistemas biológicos *in vivo* evaluándose posteriormente los parámetros sanguíneos.

Como es de relevante interés, seguidamente comparamos los resultados sugeridos en la literatura científica con los presentados en la presente memoria, para discutir sobre los mismos.

En el presente trabajo se ha utilizado sangre periférica humana *in vitro* sometida a campos magnéticos de 50 Hz e intensidades 0,25 A (1,6 mT),

0,5 A (3,2 mT), 1 A (6,5 mT) y a tiempos de incubación comprendidos entre las 0 y 48 horas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los estudios *in vivo* presentes en la literatura científica han utilizado diferentes animales de experimentación y campos magnéticos de 50 Hz a diferentes intensidades y tiempos de exposición. En particular, Ragan y col. (1983) no encontraron cambios hematológicos y bioquímicos en ratas expuestas a campos eléctricos de 60 Hz y 100Kv/m durante 10, 15, 30, 60 o 120 días. Osbakken y col. (1986) expusieron ratones a campos magnéticos de 1,89 T, y no hallaron diferencias significativas en el hematocrito, conteo de leucocitos, CPK, LDH, colesterol, triglicéridos y proteínas totales en suero. Sutter y col. (1987) no observaron cambios en los niveles de glucosa séricos en ratas expuestas a campos magnéticos de 400-800 mT. Tampoco se produjeron cambios en los parámetros hematológicos de ratones expuestos a campos magnéticos de 4 T durante la etapa de apareamiento de 7 días ni durante la gestación de 18 días (Zimmermann y col. 1987). Papatheofanis y col. (1989) expusieron ratones a campo magnético de 1 T, durante 10 días, no encontrándose diferencias significativas en las concentraciones séricas de la fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, calcio y fósforo. Wolpaw y col. (1989) no detectaron diferencias en la bioquímica ni en el conteo de células sanguíneas al someter a primates a un campo de 60 Hz a 0,1 G, 0,36 G y 0,9 G durante 21 días. Margonato y col. (1995) tampoco observaron diferencias en la hematología y en la bioquímica sérica de ratas expuestas a un campo magnético de 50 Hz, 5 μ T durante

32 semanas. Boorman y col. (1997) sometieron ratas y ratones a CM de 60 Hz a las intensidades de 0,02 G, 2 G y 10 G durante 8 semanas, y en los posteriores análisis sanguíneos de los animales expuestos no se produjo ningún cambio hematológico ni bioquímico. Bonhomme-Faivre y col. (1998) tampoco hallaron diferencias significativas en los parámetros séricos: sodio, potasio, cloro, calcio, magnesio, fósforo, amilasa, CPK y LDH de ratones expuestos a CM de 5 μ T durante 350 días.

Para poder comparar las intensidades de campo magnético empleadas en nuestro trabajo con las intensidades utilizadas por los autores anteriores, hemos establecido una correspondencia de unidades de forma que la máxima intensidad de campo magnético utilizado en este estudio es 6,5 mT, es decir 65 G. Como se puede observar en los trabajos anteriores utilizan intensidades muy variadas, unas son del orden de μ T siendo muy inferiores a las utilizadas en este experimento, y otras están en el rango de T siendo por tanto muy superiores. Pero independientemente de la intensidad de campo magnético utilizado, en todos los trabajos anteriores se obtiene el mismo resultado, no se encuentran efectos de los campos magnéticos de 50 Hz en los parámetros bioquímicos séricos. Se puede concluir que la exposición *in vivo* de diferentes sistemas biológicos (ratones, ratas, primates) a campos magnéticos de 50 Hz y diversas intensidades que varían del orden de μ T a T, no afecta a los

parámetros bioquímicos séricos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta memoria ya que nosotros tampoco observamos cambios significativos en los parámetros bioquímicos séricos de sangre humana sometida *in vitro* a CM de 50 Hz a las intensidades de 0,25 A (1,6 mT), 0,5 A (3,2 mT) y 1 A (6,5 mT).

VI.3. MODIFICACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA POR LA ACCIÓN DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS DE MUY BAJA FRECUENCIA (50 Hz) Y SOBRECARGA DE MERCURIO.

Se han realizado varios estudios epidemiológicos que muestran una relación entre la exposición a campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) en sujetos que viven en las proximidades de líneas de distribución eléctrica y un incremento moderado de tumores cerebrales (Tomenius 1986, Savitz y col. 1988, Saffer y col. 1995, Ahlbom 1997) aunque en otros trabajos recientes se han obtenido resultados negativos (Kolodiyanski 1996). De ser ciertos los primeros, sus efectos causados se deberían a un efecto crónico a largo plazo y por ser vivienda, a una exposición de más de 8 horas diarias.

También existen estudios epidemiológicos referentes a la exposición ocupacional a campos magnéticos (CM), que han encontrado asociación entre la aparición de tumores cerebrales y la exposición a CM de 50 Hz (Savitz y Loomis 1995, Floderus y col. 1993, Theriault y col. 1994). En otros trabajos sin embargo los resultados han sido negativos (Sahl 1993).

En un estudio combinando la exposición ocupacional y residencial a campos magnéticos de muy baja frecuencia (CM-MBF) se observó un

aumento del riesgo de leucemia (Feychting 1997); sin embargo en otro estudio de las mismas características no se obtuvieron datos concluyentes sobre tumores cerebrales (Kheifets y col. 1997). Se han realizado también varios trabajos sobre la aparición de tumores cerebrales y neuroblastoma en niños cuyos padres han estado sometidos a una exposición ocupacional de campos magnéticos de 50 Hz (Nasca y col. 1988, Johnson y col. 1989, Bunin y col. 1990, Wilkins y col. 1990). Los resultados positivos de los dos primeros estudios no fueron confirmados por los demás.

Por otro lado, un grupo de estudios recientes ha revelado una tendencia al incremento del riesgo de algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y esclerosis múltiple en trabajadores de industrias relacionadas con la energía eléctrica (Davanipour y col. 1997, Johansen y col. 1999).

Como podemos comprobar anteriormente en la literatura científica no está claro si existe una relación entre campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y la mayor incidencia de tumores cerebrales o del sistema nervioso. Por ello el objeto de este experimento es estudiar el efecto de los CM de 50 Hz sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) de ratones de forma que podamos tener más información sobre los posibles efectos que provocan los CM en el cerebro.

También se estudia el efecto combinado de los CM y el metal pesado mercurio en la permeabilidad de esta barrera.

El mercurio es neurotóxico, tiene importantes efectos en el desarrollo y función cerebral. Este metal después de una intoxicación crónica y aguda se acumula en el cerebro y médula espinal sobre todo en el área estriada, también se localiza en el cerebelo. A nivel celular el mercurio se encuentra principalmente en las neuronas, aunque también se acumula en el citoplasma de las células de la glía y las células ependimales (Moller y col. 1986, WHO 1990, Langford y col. 1999).

En los animales el mercurio inorgánico puede atravesar la BHE y entrar en las neuronas motoras, bajas dosis de mercurio inorgánico son retenidas por estas neuronas, de forma que esta neurotoxina puede tener un significado muy importante en algunas enfermedades neurológicas (Pamphlett y col. 1996).

Una vez en el cerebro el mercurio, que es un inhibidor del transporte de aminoácidos, daña el transporte de glutamato en los astrocitos, provocando una excesiva acumulación de glutamato en el espacio extracelular del sistema nervioso central, que produce daño excitotóxico (Albrecht y col. 1996). El mercurio también induce alteraciones en la homeostasis del calcio, bloquea los canales de calcio en el nervio terminal provocando una disminución del

flujo de calcio y un bloqueo en la liberación de neurotransmisores (Denny y col. 1996).

En nuestro trabajo vamos a estudiar el efecto que tiene esta neurotoxina en la permeabilidad de la BHE. La BHE es un complejo neurovascular que actúa como un filtro permitiendo el paso selectivo de diversas sustancias desde la sangre al cerebro. Los capilares cerebrales se caracterizan porque las células endoteliales presentan unas uniones muy estrechas, además estas células contienen muchas mitocondrias, lo que indica la existencia de procesos activos de transporte y de metabolismo energético. Estas células endoteliales se encuentran rodeadas por una membrana basal y por células gliales. La BHE es un elemento funcional de protección de las células nerviosas. Su alteración, presente en diversas patologías cerebrales, conlleva graves daños para la función neuronal.

La naturaleza de los compuestos que atraviesa la BHE es también importante para su transferencia. Entre las características fisicoquímicas requeridas para el pasaje de compuestos a través de la BHE están el bajo peso molecular y la lipofilia. De forma que la BHE es muy permeable al agua, oxígeno, dióxido de carbono y a la mayoría de las sustancias liposolubles. Es ligeramente permeable a los electrolitos y casi totalmente impermeable a las proteínas. Existen compuestos que utilizan transportadores endógenos

específicos para atravesar la BHE como es el caso de la glucosa y los aminoácidos, otros sin embargo la franquean a través de canales iónicos.

En nuestro trabajo vamos a determinar la permeabilidad de la BHE en ratones BALB/c expuestos a CM de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT) durante 7 días y también se estudia el efecto conjunto de los CM y una sobrecarga de mercurio en la permeabilidad de la misma.

La permeabilidad se evalúa por el paso del colorante vital rojo neutro inyectado por vía intravenosa al cerebro, realizándose la lectura espectrofotométrica del rojo neutro a 540 nm. La absorbancia del rojo neutro que obtenemos es una medida de la cantidad de colorante ingresado al cerebro y por tanto es una forma de determinar la permeabilidad de la BHE, a mayor absorbancia del rojo neutro mayor será la permeabilidad de la BHE (García-Arribas y col. 2001, Ribas y col. 2001d).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el tratamiento con sobrecarga de mercurio produce un aumento significativo de la permeabilidad de la BHE. Nuestros resultados coinciden con los estudios realizados por Kuwabara y col. (1989) con un compuesto orgánico del mercurio, el metilmercurio, los autores observaron un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratas después del tratamiento con metilmercurio. Este compuesto se sabe que penetra a través de la BHE como un complejo

con cisteína a través de un sistema transportador de aminoácidos neutros (Kerper y col. 1992). Yasutake y col (1998) observaron que los compuestos de mercurio: metilmercurio y mercurio metálico penetran a través de la BHE al cerebro y producen daño neurológico.

En cuanto al cloruro de mercurio, que es el compuesto que hemos utilizado para intoxicar a los ratones, se sabe que es un compuesto productor de radicales libres (Brawer y col. 1998, Pamphlett y col. 1998, Chae y col. 2000, Schurz y col. 2000) y estudiando su comportamiento en el cerebro se ha observado una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa en cerebelo y una disminución de la glutatión peroxidasa en cerebro y cerebelo, por tanto el estrés oxidativo puede contribuir al desarrollo de desórdenes neurodegenerativos causados por la intoxicación con mercurio (Hussain y col. 1997). Además complementando el trabajo anterior se han realizado experimentos exponiendo células endoteliales cerebrales a diferentes compuestos capaces de provocar la generación de radicales libres obteniéndose una relación entre las especies reactivas de oxígeno y la apertura de la BHE (Lagrange y col. 1999). Por tanto relacionando los dos estudios anteriores se puede concluir que un mecanismo mediante el cual el mercurio puede provocar un aumento de la permeabilidad de la BHE es mediante la formación de radicales libres.

Por otro lado se sabe que la ATPasa Na/K de la BHE juega un papel muy importante en el mantenimiento de un ambiente constante en el cerebro durante las fluctuaciones en la composición del plasma (Keep y col. 1999). El mercurio inhibe *in vitro* la actividad de la ATPasa Na/K de cerebro de rata (Maier y col. 1990) y también inhibe la actividad de la ATPasa Na/K de los sinaptosomas cerebrales de una manera dosis-dependiente (Rajanna y col. 1990). Por tanto otro mecanismo por el cual el mercurio puede aumentar la permeabilidad de la BHE es mediante su actuación sobre la ATPasa Na/K. Otros autores han observado que el mercurio produce alteraciones en la homeostasis de unos componentes de la BHE, los astrocitos, de forma que bajas concentraciones de este metal pueden inhibir la capacidad de los astrocitos para mantener un gradiente de K^+ transmembrana, pudiéndose modificar también el transporte a través de la BHE (Zheng y col. 1991).

Otro resultado obtenido del presente estudio es el aumento significativo de la permeabilidad de la BHE con la exposición de ratones a CM 50 Hz, 27,5 G (2,75 mT) durante 7 días. Existen muy pocos trabajos en la literatura científica dedicados al estudio de los campos magnéticos y su efecto en la permeabilidad de la BHE. En particular, Garber y col (1989) observaron un aumento del transporte en las células endoteliales del capilar cerebral, produciéndose por tanto una mayor permeabilidad de la BHE en ratas expuestas a un campo magnético de 1,5 T, 0,5 T y 0,3 T. Prato y col. (1990)

confirmaron los resultados anteriores, observando un aumento de la permeabilidad de la BHE en ratas expuestas a campos magnéticos de 50 Hz y 0,15 T. En estudios posteriores, los mismos investigadores expusieron ratas a campos magnéticos de mayor intensidad (1,5 T) produciéndose también un aumento de la permeabilidad de la BHE (Prato y col. 1994). En 1998, Burchard y col. expusieron vacas a campos magnéticos de 60 Hz, 10kv/m y 30 μ T y observaron un aumento de la permeabilidad de la BHE. Person y col. (1992) y Salford y col. (1994) realizaron varios estudios en los que encontraron un aumento de la permeabilidad de la BHE en ratas inducida por campos magnéticos de diversas intensidades y por campos electromagnéticos de RF concretamente de 915 MHz y SAR 0,016 W/Kg.

Los resultados obtenidos en la presente memoria coinciden con los publicados por los anteriores autores, que en todos los casos refieren un aumento de la permeabilidad de la BHE después de la aplicación *in vivo* de campos magnéticos de diversas intensidades.

Una vez discutido el efecto del mercurio y del campo magnético en la permeabilidad de la BHE solo nos queda comentar el efecto conjunto de ambos factores. Nuestros resultados indican que el efecto combinado del tratamiento con sobrecarga de mercurio y la exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT) produce un aumento significativo de la

permeabilidad de la BHE con respecto al control (sin mercurio y sin campo electromagnético), con respecto al grupo tratado solamente con sobrecarga de mercurio y también con respecto al grupo tratado solo con los campos magnéticos. Se puede concluir que existe un sinergismo entre el tratamiento con sobrecarga de mercurio y la exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT), traduciéndose en un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro.

El mecanismo por el cual el campo magnético puede alterar la permeabilidad de la BHE es desconocido. Los autores que en la literatura refieren un aumento de la permeabilidad de la BHE con la aplicación de campos magnéticos, no explican su mecanismo de acción. Otros autores como Toropset y col. 1981, intentan explicar los cambios observados en la microcirculación del cortex cerebral de ratas expuestas a CM 50 Hz debido a desórdenes en el balance agua-electrolitos en los componentes celulares y fibrosos de los vasos sanguíneos, células de la glía y en el aparato dentrítico provocados por el propio CM. En general se sabe que, la interacción física de los campos electromagnéticos de 50 Hz y los tejidos vivos es la inducción de cargas y corrientes eléctricas. Si se produce un efecto biológico debe relacionarse con el subsiguiente proceso electroquímico, probablemente en la membrana celular. En los seres vivos existen corrientes eléctricas endógenas, provocadas por reacciones químicas normales, y se ha propuesto que sólo

aquellos campos magnéticos capaces de inducir corrientes significativamente más intensas que las fisiológicas podrían ser susceptibles de provocar efectos adversos inmediatos, en este caso las corrientes inducidas podrían actuar modificando el transporte de iones a través de la membrana y los canales de membrana.

Podemos concluir diciendo que, actualmente no se conoce el mecanismo por el cual los campos magnéticos pueden modificar la permeabilidad de la BHE, por tanto se deberían realizar más experimentos siguiendo esta línea de investigación para aportar nuevos datos que nos ayuden a comprender el mecanismo de acción de los CM en la permeabilidad de la BHE.

VI.4. VARIACIÓN DE LAS PROPIEDADES ELÉCTRICAS DE TEJIDOS ANIMALES SOMETIDOS A RADIOFRECUENCIA Y SOBRECARGA DE IONES: CADMIO Y MERCURIO.

Los mecanismos de interacción entre los campos electromagnéticos de radiofrecuencia y los sistemas biológicos han sido estudiados durante las últimas décadas y se han desarrollado algunos modelos teóricos para explicar como las cargas interactúan con los campos electromagnéticos en materiales biológicos (Chiabrera 1995).

De forma general, la materia expuesta a una radiación electromagnética está sometida a la acción de un campo magnético y eléctrico. En concreto, los tejidos vivos están poco magnetizados, por lo que la componente eléctrica es primordial e induce diversos procesos intramoleculares, como desplazamiento y movimiento de cargas, que disminuyen después de la eliminación del campo. El desplazamiento de cargas produce un cierto grado de polarización dentro del material, el ejemplo más importante de polarización es la orientación parcial de las moléculas polares. El movimiento de cargas provoca una conducción de las mismas y el establecimiento de corrientes iónicas. Las magnitudes relativas de estos efectos dependen de las propiedades de la estructura sobre la que incide el campo, conductividad y permitividad.

Todo tejido vivo está caracterizado por su conductividad eléctrica (σ) y su permitividad (ϵ) ambas constituyen las propiedades dieléctricas de la materia. Estas propiedades son responsables de la interacción de los campos electromagnéticos con moléculas y estructuras biológicas. En general las propiedades dieléctricas de los tejidos son una medida global de las interacciones con un campo eléctrico a nivel molecular. En concreto, la permitividad es una medida de la capacidad de un material para resistir la formación de un campo eléctrico, así valores elevados de la permitividad implican un efecto de apantallamiento considerable para el campo eléctrico. En cuanto a la conductividad ésta será mayor cuanto mayor sea la circulación de corrientes inducidas en los tejidos.

En la presente memoria se estudia la variación de las propiedades dieléctricas en diferentes tejidos de rata, tratados con sobrecarga de metales pesados, en concreto cadmio y mercurio. Ambos metales son contaminantes ambientales que muestran una gran diversidad de efectos tóxicos.

La acción tóxica de estos metales pesados en los tejidos biológicos puede llegar a producir una alteración importante de sus propiedades eléctricas, y una modificación de su función biológica.

En el presente trabajo se determinan las propiedades dieléctricas (permitividad y conductividad) de diferentes tejidos de rata aplicando un CEM

de radiofrecuencia concretamente de 2,45 GHz después de haber sometido a los animales a una sobrecarga de metales pesados: cadmio y mercurio. Los tejidos estudiados son: riñón, hígado, páncreas, pulmón y tejido muscular. También se realizan análisis sanguíneos a las ratas antes del sacrificio, para conocer sus correspondientes parámetros hematológicos, bioquímicos y enzimáticos. Posteriormente se determina la cantidad de metal presente en cada tejido mediante la técnica de plasma de acoplamiento inductivo asociado a un espectrómetro de masas (ICP-MS), una técnica de gran sensibilidad que nos ha permitido detectar concentraciones de iones metálicos del orden de ppm.

A continuación vamos a establecer una relación entre los cambios observados en la permitividad y conductividad de los diferentes tejidos con los parámetros sanguíneos y con la cantidad de metal presente en cada tejido. Se realiza un análisis exhaustivo de cada tejido por separado.

Hígado

El tejido hepático con sobrecarga de cadmio presenta una disminución significativa ($p < 0,05$) en la permitividad con respecto al tejido control. En el caso del mercurio, la permitividad en hígado, experimenta un aumento significativo respecto al control ($p < 0,05$).

En lo referente a la conductividad, se detecta una disminución significativa ($p < 0,05$) en los tejidos con sobrecarga de cadmio, y extremadamente significativa en los tejidos con sobrecarga de mercurio ($p < 0,001$) con respecto al grupo control.

Las diferencias significativas encontradas en ambas permitividad y conductividad para el cadmio están en concordancia con los resultados obtenidos del análisis sanguíneo, en el que se observa un aumento de la actividad enzimática de la transaminasa GOT (de 93,5 a 275 U/L) y de la zinc-metaloenzima LDH (de 252,5 a 1004 U/L) en suero que indica la existencia de daño hepático por acumulación de este metal en hígado. Estos resultados sanguíneos coinciden con los de otros autores que han observado un aumento de las concentraciones en plasma de enzimas séricas y un descenso de la integridad estructural de los hepatocitos después del tratamiento con cadmio (Novelli y col. 1998).

Los análisis anteriores se complementan con el de ICP-MS en el que se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) de la concentración de cadmio en el grupo tratado con este metal con respecto al control. Éste era un resultado previsible, porque se sabe que el cadmio se acumula en hígado después de un envenenamiento agudo y crónico y provoca daño hepático que es previo al fallo renal (Dudley y col. 1985, LatinWo y col 1997, Nasser 2000).

En lo relativo al mercurio, los cambios obtenidos en la permitividad y la conductividad pueden deberse también al efecto tóxico del mercurio en el hígado, coincidiendo con los análisis sanguíneos, donde se observa un aumento de la actividad enzimática de la LDH (de 252,5 a 578 U/L). Además el análisis de ICP-MS revela una acumulación de este metal en hígado, detectándose un incremento significativo ($p < 0,05$) de la concentración de mercurio en el tejido con sobrecarga de Hg con respecto al control.

Riñón

Se observa una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en la permitividad y conductividad para los tejidos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio respecto al grupo control.

El hecho de que el riñón sea el principal tejido diana para la toxicidad de los metales pesados, podría explicar los cambios observados en la permitividad y en la conductividad.

Como es sabido el cadmio se acumula en la corteza renal, provocando disfunción de los túbulos proximales de forma que se altera el mecanismo de reabsorción de los mismos (Goyer 1991, Ikeda 2000). Por su parte, el

mercurio se acumula principalmente en el riñón y concretamente en los túbulos proximales y causa nefropatía severa, caracterizada por una extensiva pérdida de la función de los túbulos proximales (Zalups 1991, 2000).

Los resultados obtenidos en el análisis con ICP-MS concuerdan con lo expuesto anteriormente ya que se observa que estos metales se acumulan principalmente en riñón encontrándose un aumento muy significativo ($p < 0,05$) en la concentración de cadmio en los grupos tratados con este metal respecto del control, sucediendo lo mismo en el caso de los grupos tratados con sobrecarga de mercurio.

Pulmón

Se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en la permitividad con respecto al grupo control para los tejidos tratados con sobrecarga de cadmio y de mercurio.

Las medidas de la conductividad revelan una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en los tejidos tratados con cadmio y con mercurio respecto del grupo control.

Las diferencias observadas en la permitividad y conductividad del pulmón pueden ser debidas a los efectos tóxicos de los metales en los pulmones. En concreto, estudios previos con ratas expuestas a cadmio muestran que este metal puede ejercer su efecto tóxico también en el sistema respiratorio, caracterizado por inflamación, necrosis y fibrosis del pulmón (Bernard y col. 1986, Lauwerys y col. 1990).

Por otro lado el análisis sanguíneo muestra que las ratas tratadas con cadmio y con mercurio tienen valores más bajos de hematocrito y hemoglobina que indica la aparición de un estado anémico. En el caso del cadmio éste tiene elevada afinidad por la hemoglobina de forma que compite con el hierro para unirse a ella, también afecta a la médula ósea y al metabolismo de los eritrocitos (Shaik y col. 1980).

En el análisis de ICP-MS no se detectan cambios significativos en la concentración de metal en los grupos tratados con cadmio y con mercurio al grupo control, se puede concluir por tanto que estos metales no se acumulan en el pulmón.

Páncreas

Los valores de permitividad revelan que el tratamiento con mercurio produce un aumento significativo ($p < 0,05$) y el tratamiento con cadmio provoca un aumento extremadamente significativo ($p < 0,001$) respecto al control.

En cuanto a la conductividad se observa una disminución muy significativa ($p < 0,001$) en los tejidos con sobrecarga de cadmio y de mercurio respecto al grupo control.

Las diferencias observadas en la permitividad y conductividad pueden ser debidas a los efectos tóxicos que producen estos metales pesados en el páncreas y a su acumulación en éste órgano. En concreto, el tratamiento con cadmio provoca una disfunción de las células “Islotes de Langerhans” que producen la insulina necesaria para la regulación del metabolismo de los carbohidratos, además el páncreas se vuelve blando, con aspecto esponjoso y su color cambia a marrón rojizo (Kostial y col. 1983, Yannai y col 1993).

El cadmio así como el resto de los metales pesados induce una excesiva secreción de insulina plasmática provocando unos niveles bajos de azúcar en sangre. Esto se confirma con los análisis sanguíneos donde se detecta una

disminución de la concentración de glucosa tanto en el grupo de ratas tratadas con cadmio como en el grupo tratado con mercurio respecto del control obteniéndose los siguientes valores para la glucosa en el grupo tratado con cadmio, mercurio y el control respectivamente: 109 g/100mL, 123,6 g/100mL y 166 g/100mL. Por tanto la toxicidad de estos metales pesados induce la producción inadecuada de insulina que puede provocar la aparición de algunas enfermedades como diabetes mellitus o hipoglucemia.

En el análisis de ICP-MS se corrobora que los metales cadmio y mercurio se acumulan en páncreas, aunque en menor medida que en riñón. Los resultados indican un aumento significativo ($p < 0,05$) de la concentración de cadmio en el tejido con sobrecarga de cadmio respecto del control y en lo referente al mercurio también se observa una mayor concentración de este metal en los tejidos con sobrecarga de mercurio respecto del control.

Músculo

En cuanto a la permitividad, se observa una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) en los tejidos con sobrecarga de cadmio y una disminución significativa ($p < 0,01$) en los que tienen sobrecarga de mercurio respecto al grupo control.

Los valores de conductividad en los tejidos con sobrecarga de cadmio y de mercurio presentan una disminución extremadamente significativa ($p < 0,001$) con respecto al grupo control.

Los resultados indican que el cadmio tiene una fuerte influencia en ambas, permitividad y conductividad.

El cadmio al igual que el calcio tiene un significado muy importante en los procesos enzimáticos implicados en la contracción muscular, de forma que compite de forma activa con el calcio en estos sistemas enzimáticos, y produce daño en el tejido muscular (Wilson y col. 1997). La disminución significativa observada en la permitividad y en la conductividad por el cadmio pueden ser debidas al daño muscular que provoca este metal. Los resultados anteriores se confirman con el análisis sanguíneo, en el que se observa un aumento de la actividad de la enzima creatinfosfoquinasa (CPK) (de 277,5 a 651,5 U/L) implicada en la producción de energía muscular mediante la síntesis de ATP, indicando la existencia de daño muscular.

En el análisis posterior de ICP-MS no se detecta un aumento significativo de la concentración de cadmio en el grupo tratado con este metal respecto del control. Con el mercurio sucede lo mismo, tampoco se producen diferencias en la concentración de mercurio en los tejidos tratados con este ión metálico respecto a los controles, por tanto no se ha observado que estos metales pesados cadmio y mercurio se acumulen en el músculo.

En este trabajo hemos determinado las propiedades dieléctricas de varios tejidos biológicos aplicando un campo electromagnético de radiofrecuencia concretamente de 2,45 GHz. Se ha evaluado el efecto de los metales pesados cadmio y mercurio sobre las propiedades dieléctricas de los tejidos estudiados. Como conclusión se puede sugerir que la exposición de los tejidos biológicos a sobrecarga de metales pesados cadmio y mercurio altera sus propiedades dieléctricas. Se han encontrado incrementos con diferencias estadísticamente significativas en la permitividad y conductividad de los tejidos con sobrecarga de cadmio y con sobrecarga de mercurio respecto de los controles. En cada tejido se han relacionado los cambios observados en la permitividad y conductividad con los efectos tóxicos que estos metales producen en los mismos, con los resultados del análisis sanguíneo y con la cantidad de metal presente en cada tejido mediante la técnica de ICP-MS (García-Arribas y col. 1999b, 2000b, Ribas y col. 2001b).

Por otro lado, los trabajos disponibles en la literatura científica sobre las propiedades dieléctricas de los tejidos se centran en caracterizar las propiedades dieléctricas de diferentes tejidos biológicos, bien sean de animales o humanos aplicando campos electromagnéticos de radiofrecuencia (Stuchly y Stuchly 1980, Schawn 1983, Foster y Schwan 1989). En los últimos años varios autores han medido las propiedades dieléctricas de tejidos aplicando distintos rangos de radiofrecuencia, de 1,5 a 6 GHz (Land y col.

1992) entre 5 KHz y 100 KHz usando tejido pulmonar (Nopp y col. 1993) y entre 100 KHz y 500 MHz utilizando tejidos fetales humanos (Lu y col. 1996). Actualmente los trabajos más importantes sobre este tema son los de Gabriel y col. (1996a, 1996b y 1996c) ya que caracterizaron las propiedades dieléctricas de los tejidos en un rango de frecuencias entre 10 Hz a 100 GHz utilizando tejidos humanos y animales.

Sin embargo, no hay ningún trabajo en la literatura científica en el que se estudie el efecto de una sobrecarga de metales pesados en la propiedades dieléctricas de los tejidos, utilizando un campo electromagnético de radiofrecuencia. Por tanto no podemos comparar los resultados obtenidos en esta memoria con ningún trabajo anterior. Estos resultados tienen por tanto originalidad en el ámbito de los efectos de los campos electromagnéticos sobre los seres vivos. Por otra parte, las patologías de tesaurismosis de iones metálicos o de sobrecarga metálica pueden tener otros efectos desconocidos en individuos que estén expuestos de forma crónica a los campos electromagnéticos de radiofrecuencia.

VII. CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones sobre el efecto biológico de los campos magnéticos de muy baja frecuencia (50 Hz) y de radiofrecuencia (2,45 GHz) relacionándolo a su vez con el de los metales pesados cadmio y mercurio. Este enfoque se debe a la generalizada y frecuente contaminación medioambiental de los agentes experimentales, y a la existencia de patologías de tesaurismosis de iones metálicos como consecuencia de su acumulación en los seres vivos. En esta memoria se siguen también las recomendaciones del Parlamento Europeo que aconseja estudiar fenómenos de sinergia entre las radiaciones no ionizantes y agentes químicos ambientales.

1.- La exposición de linfocitos humanos de sangre periférica a campos magnéticos de 50 Hz e intensidades hasta 1,5 A (9,7 mT) durante 96 h no produce efectos genotóxicos ya que no varía la frecuencia espontánea de micronúcleos a ninguna de las intensidades estudiadas.

2.- El tratamiento de linfocitos humanos con metales pesados cadmio y mercurio respectivamente, a las concentraciones comprendidas entre 10^{-3} M y 10^{-7} M durante 96 horas provoca un aumento del número de micronúcleos que es dosis-dependiente. Con el cadmio este aumento es significativo para las concentraciones entre 10^{-4} M y 10^{-6} M y con el mercurio para las concentraciones de 10^{-4} M y 10^{-5} M, siendo la concentración de 10^{-3} M tóxica para ambos metales.

3.- En el ensayo de micronúcleos no se ha observado efecto sinérgico entre los metales pesados y el campo magnético de 50 Hz independientemente de la concentración de metal y de la intensidad del campo magnético aplicado.

4.- La aplicación de campos magnéticos de 50 Hz e intensidades hasta 1 A (6,5 mT) en linfocitos humanos de sangre periférica durante 96 horas no produce cambios en la proliferación celular. Sin embargo con la intensidad de 1,5 A (9,7 mT) acaece una disminución de la misma debido a un aumento de la temperatura en los cultivos expuestos.

5.- El tratamiento de linfocitos humanos con iones de cadmio y de mercurio respectivamente, a las concentraciones comprendidas entre 10^{-3} M y 10^{-7} M provoca una disminución de la proliferación celular a medida que aumenta la concentración de cadmio y de mercurio, siendo significativa para la concentración de metal $\geq 10^{-5}$ M. Para ambos metales la concentración de 10^{-3} M es tóxica para las células utilizadas, siendo el cultivo inviable.

6.- En el ensayo de proliferación celular no se observa efecto sinérgico entre el metal (cadmio, mercurio) y el campo magnético de 50 Hz aplicado, independientemente de cual sea la concentración de metal y la intensidad de campo magnético utilizada.

7.- La exposición de sangre periférica humana a campos magnéticos de 50 Hz e intensidades hasta 1 A (6,5 mT) y diferentes tiempos de incubación comprendidos entre 0 y 48 horas, no produce cambios significativos en las concentraciones séricas de proteínas totales, glucosa, urea, calcio, fósforo y hierro, ni en las actividades enzimáticas de LDH, CPK, GPT y GGT independientemente del tiempo de exposición y de la intensidad de campo magnético utilizada.

8.- La incubación de sangre humana a diferentes tiempos comprendidos entre 0 y 48 horas, independientemente de la acción del campo magnético, no provoca cambios en la concentración de las proteínas totales y en cuanto a la LDH, se observa un ligero aumento no significativo de la actividad enzimática en función del tiempo. Sin embargo se ha encontrado un incremento significativo de la concentración de fósforo a partir de las 12 horas de incubación.

9.- Se detecta un incremento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al colorante vital rojo neutro en cerebro de ratones Balb/c por exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT) durante 7 días.

10.- El tratamiento de ratones con sobrecarga de iones mercurio (neurotóxico), durante 7 días, provoca también un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro. El análisis de los resultados muestra que es mayor la acción del metal sobre la permeabilidad de la barrera que la del campo magnético de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT).

11.- Hallamos sinergismo entre el tratamiento con sobrecarga de mercurio y la exposición a campos magnéticos de 50 Hz y 27,5 G (2,75 mT) durante 7 días, produciéndose un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica al rojo neutro en cerebro de ratón.

12.- Se determinan las propiedades eléctricas: conductividad y permitividad de diferentes tejidos de rata con sobrecarga de iones cadmio y de mercurio aplicando un campo electromagnético de radiofrecuencia, 2,45 GHz. La exposición de los tejidos biológicos: hígado, riñón, pulmón, páncreas y músculo a una sobrecarga de cadmio y de mercurio altera sus propiedades dieléctricas.

13.- En los tejidos con sobrecarga de cadmio se ha encontrado una disminución significativa de la permitividad en hígado, riñón, pulmón y músculo y un aumento de la permitividad en páncreas. En los tejidos con sobrecarga de mercurio se produce una disminución de la permitividad en el riñón, pulmón y músculo, y un aumento en hígado y páncreas.

14.- Los valores de la conductividad revelan que el tratamiento con cadmio y con mercurio provoca una disminución significativa en todos los tejidos respecto a los controles.

15.- Los resultados del análisis de sangre en el grupo de ratas tratadas con cadmio muestran un aumento de las enzimas GOT y LDH que indica la existencia de daño hepático por acumulación de este metal en hígado y una elevación en suero de la CPK indicativa de daño muscular. La administración de mercurio produce también un aumento de la enzima LDH.

16.- El tratamiento con cadmio y con mercurio produce una disminución de la concentración de glucosa sérica debido al efecto tóxico que estos metales provocan en el páncreas, del mismo modo, se observa una disminución de los valores de hematocrito y hemoglobina que indica la aparición de un estado anémico.

17.- El análisis de ICP-MS revela que el tratamiento con sobrecarga de cadmio y de mercurio produce una acumulación de iones metálicos, en hígado, páncreas y riñón, siendo la concentración de metal en riñón superior a la de páncreas e hígado; sin embargo en pulmón y músculo no se produce acumulación significativa de estos metales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ACGIH. "American Conference of Government Industrial Higiениists" Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, OH: American Conference of Government Industrial Higiениists, 1996.

Adey W.R. Tissue interaction with non-ionizing electromagnetic fields. *Physiol. Rev.* 61: 435-514, 1981.

Adey W.R. Electromagnetics in Biology and Medicine. In Matsumoto H. *Modern science Oxford University press* 227-245, 1993.

Ahlbom A. Residential epidemiological studies. En: Matthes R., Bernhardt J.H. and Repacholi M.H., eds. *Biological effects of static and ELF electric magnetic fields.* Oberschleissheim, Germany: ICNIRP Publication 4: 185-190, 1997.

Ahlbom A., Day N., Feychting M., Roman E., Skinner J., Dockerty J., Linet M., McBride M., Michaelis M., Olsen J. H., Tynes T., Verkasalo P.K. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br. J. Cancer.* 83 (5): 692-698, 2000.

Akerstedt T., Arnetz B., Ficca G., Paulsson L.E., Kallner A. A 50-Hz electromagnetic field impairs sleep. *J. Sleep. Res.* 8 (1): 77-81, 1999.

Albrecht J., Matyja E. Glutamate: a potential mediator of inorganic mercury neurotoxicity. *Metab. Brain. Dis.* 11 (2): 175-184, 1996.

Al-Nasser I.A. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38 (4): 407-413, 2000.

Al-Sabti K., Lloyd D.C., Edwards A.A., Stegnar P. A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. *Mutat. Res.* 280 (3): 215-223, 1992.

Alpeter E.S. et al. BEW Publication Series, Study N° 55, Berne, pp. 155, 1995.

Amouroux D. Wasserman J.C., Tessier E., Donard O.F.X.. Elemental mercury in the atmosphere of a Tropical Amazonian Fores (French Guiana). *Environ. Sci. Technol.* 33 (17): 325-329, 1999.

Andersen H.R., Nielsen J.B., Grandjean P. Toxicological evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology* 144 (1-3): 121-127, 2000.

Angelillo I.F., Villar P. Residential exposure to electromagnetic fields and childhood leukaemia: a meta-analysis. *Bull. WHO* 77: 906-915, 1999.

Antonopoulus A., Yang B., Stamm A., Heller W.D., Obe G. Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.* 346: 151-157, 1995.

Anwar W.A., Gabal M.S. Cytogenetic study in workers occupationally exposed to mercury fulminate. *Mutagenesis* 6 (3): 189-192, 1991.

Asano S., Eto K., Kurisaki E., Gunji H., Hiraiwa K., Sato M., Sato H. et al. Review article: acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning. *Pathol. Int.* 50 (3): 169-174, 2000.

Aschner M., Pless R., Risher J.F. Mercury toxicity. *J. Pediatr.* 138 (3): 450-451, 2001.

ATSDR “ Agency for Toxic Substances and Disease Registry”. Toxicological profile for cadmium. Atlanta. GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, 1999.

ATSDR “ Agency for Toxic Substances and Disease Registry”. Toxicological profile for mercury. Atlanta. GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, 1999.

Bako G., Smith ESO, Hanson J., Dewar R. The geographical distribution of high cadmium concentrations in the environment and prostate cancer in Alberta. *Can. J. Public Health.* 73: 92-94, 1982.

Barbiroli B., Montagna P., Martinelli P., Lodi R., Iotti S., Cortelli P., Funicello R., Zaniol P. Defective brain energy metabolism shown by in vivo ³¹P MR spectroscopy in 28 patients with mitochondrial cytopathies. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 13 (3): 469-474, 1993.

Bauchinger M, Hauf R, Schmid E., Drisp J. Analysis of structural chromosome changes and SCE after occupational long-term exposure to electric and magnetic fields from 380kV systems. *Radiat. Environ. Biophys.* 19: 235-238, 1981.

Bhattacharyya M.H. Cadmium-induced bone loss: increased susceptibility in females. *Water Air Soil Pollution*, 1991.

Bell G.B., Marino A.A., Chesson A.L., Struve F. Human sensitivity to magnetic fields. *Lancet* 338: 1521-1522, 1991.

Bell G.B., Marino A.A., Chesson A.L., Struve F. Alterations in brain electrical activity caused by magnetic fields: Detecting the detection process. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology.* 83: 389-397, 1992.

Bench G., Corzett M.H., Martinelli R., Balhorn R. Cadmium concentrations in the testes, sperm, and spermatids of mice subjected to long-term cadmium chloride exposure. 35: 30-36, 1999.

Bennet W.R. Cancer and power lines. *Phys. Today.* 1: 23-29, 1994.

Berces J., Otos M. Szirmai S., Crane-Urena C., Koteles G.J. Using the micronucleus assay to detect genotoxic effects of metal ions. *Environ. Health. Perspect.* 101 (3): 11-13, 1993.

Berglund M., Akesson A., Gjellerup P., Vahter M., Alexander J., Taehti H., Seiler J.P. Metal-bone interactions. *Toxicology Letters.* 112-113 (1-3): 219-225, 2000.

Bergqvist U., Whalberg J. Skin symptoms and disease during work with visual display terminals. *Cont. Derm.* 30: 197-204, 1994.

Bergqvist U., Vogel E. Possible health implications of subjective symptoms and electromagnetic field. Report of European group experts for the European Commission. DGV. Edited by U. Bergqvist and E. Bogel. *Arbete och Hälsa.* Swedish National Institute for Working Life, Stockholm, Sweden. ISBN 91-7045-438-8, 1997.

Berman L., Chacon L., House D., Koch B.A., Koch W.E., Leal J., Lovtrup S. y col. Development of chicken embryos in a pulsed magnetic field. *Bioelectromagnetics* 11: 169-187, 1990.

Blank M. Electric and magnetic field signal transduction in the membrane Na-K ATP-ase. *Adv. Chem.* 250: 339-348, 1995.

Bondía S., Ribas B., De la Torre A.M., Santos Ruiz A. Zn-Cd-metallothionein induced by cadmium administration. In: *Akademiai Kiado and Academic Press (T. Gati, L.G. Szollar and Gy. Ungavary, eds.)*. *Adv. Physiol. Sci.* 12: 71-75, 1981.

Bonhomme-Faivre L., Mace A., Bezie Y., Marion S., Bindoula G., Szekely A.M., Frenois N. y col. Alterations of biological parameters in mice chronically exposed to low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields. *Life Sci.* 62 (14): 1271-80, 1998.

Bonnatti S., Cavalieri Z., Viaggi S., Abbondandolo A. The analysis of 10 potential spindle poisons for their ability to induce CREST-positive micronuclei in human diploid fibroblasts. *Mutagenesis.* 7 (2): 111-114, 1992.

Boorman G.A., Gauger J.R., Johnson T.R., Tomlinson M.J., Findlay J.C., Travlos G.S., McCormick D.L. Eight-week toxicity study of 60 Hz magnetic fields in F344 rats and B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 35 (1): 55-63, 1997.

Boorman G.A., McCormick D.L., Ward J.M., Haseman J.K., Sills R.C. Magnetic fields and mammary cancer in rodents: a critical review and evaluation of published literature. *Radiat. Res.* 153 (5): 617-626, 2000.

Boucher B.A., Hanes S.D. Pharmacokinetic alterations after severe head injury . Clinical relevance. *Clin. Pharmacokinet.* 35 (3): 209-221, 1998.

Braunwald E. *Principios de medicina interna*. Editores Interamericana. Mc Graw Hill, 1989.

Brawer J.R., McCarthy G.F., Gornitsky M., Frankel D., Nehindate K., Schipper H.M. Mercuric chloride induces a stress response in cultures astrocytes characterized by mitochondrial uptake of iron. *Neurotoxicology.* 19 (6): 767-776, 1998.

Brusick D., Albertini R., McRee D., Peterson D., Williams G., Hanawalt P., Preston J. Genotoxicity of radiofrequency radiation. DNA/Genetox Expert Panel. Environ. Mol. Mutagen. 32 (1): 1-16, 1998.

Bunin G.R., Ward E., Kramer S., Rhee C.A., Meadows A.T. Neuroblastoma and parental occupation. Am.J. Epidemiol. 131: 776-780, 1990.

Burch J. Am. J. Epidemiol. 159: 27-30, 1999.

Burchard J.F., Nguyen D.H., Richard L., Young S.N., Heyes M.P., Block E. Effects of electromagnetic fields on the levels of biogenic amine metabolites, quinolinic acid, and beta-endorphin in the cerebrospinal fluid of dairy cows. Neurochem. Res. 23 (12): 1527-31, 1998.

Byus C.V., Lundak R.L., Fletcher R.M., Adey W.R. Alterations in kinase activity following exposure of cultured human lymphocytes to modulated microwave fields. Bioelectromagnetics. 5: 341-351, 1984.

Byus C.V., C.V., Pieper S., Adey W.R. The effects of low-energy 60 Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. Carcinogenesis. 8 (10): 1385-1389, 1987.

Byus C.V., C.V., Kartun K., Pieper S., Adey W.R. Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters. Cancer Res. 48 (15): 4222-4226, 1988.

Cain C.D., Thomas D.L., Adey W.R. Focus formation of C3H/10T1/2 cells and exposure to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field. Bioelectromagnetics. 18 (3): 237-43, 1997.

Calevro F., Beyersmann D., Hartwig A. Effect of cadmium (II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from *Pleurodeles larvae*. Toxicol. Lett. 94 (3): 217-225, 1998.

Chae H.J., Chae S.W., Kang J.S., Yun D.H. Bang B.G., Kang M.R., Kim H.M., Kim H.R. Transition metal induces apoptosis in MC3T3E1 osteoblast: Evidence of free radical release. Korean J. Physiol. Pharmacol. 4 (1): 47-54, 2000.

Chambers R.C., Laurent G.J., Westergren T.G. Cadmium inhibits proteoglycan and procollagen production by cultured human lung fibroblasts. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 19 (3): 498-506, 1998.

Chavez E., Zazueta C., Díaz E., Holguin J.A. Characterization by Hg^{2+} of two different pathways for mitochondrial Ca^{2+} release. *Biochem. Biophys. Acta* 986: 27-32, 1989.

Chiabrera A., Cadossi R., Bersani F., Franceschi, C., Bianco B. Electric and magnetic field effects on the immune system. In: Carperter D.O., Ayrapetyan S. Eds. *Biological effects of electric and magnetic fields*. San Diego, CA: Academic Press. 121-145, 1994.

Chiabrera A., Bianco B., Moggia E., Tomasi T., Kaufman J.J. Recent advantages in biophysical modelling of radiofrequency electromagnetic field interactions with living systems. In proceedings of the wireless Technology Research. State of the science colloquium. Roma November 13-15, 1995.

Chizhencova R.A., Safroshkina A.A. Electrical reactions of brain to microwave irradiation. *Electro-Magnetobiology*. 15: 253-258, 1996.

Choi B.H., Kudo M., Lapham L.W. A golgi and electronmicroscopic study of cerebellum in methylmercury poisoned neonatal mice. *Acta Neuropathol. (Berl)* 54: 233-237, 1981.

CIPRNI. "International commission on non-ionizing radiation protection". Health issues related to the use of hand held radiotelephones and base transmitter. *Health Phys.* 70: 587-593, 1996.

CIPRNI. "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: 494-520, 1998.

Cleary S.F. Liu L.M. Merchan T.E. Glioma proliferation modulated *in vitro* by isothermal radiofrequency radiation exposure. *Radiat. Res.* 121: 38-45, 1990.

Cleary S.F. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 649: 166, 1992.

Cleary SF. Effects of radio-frequency radiation on mammalian cells and biomolecules *in vitro*. En Blank M (ed). *Electromagnetic fields: Biological interactions and mechanisms*. Washington: American Chemical Society 467-477, 1995.

Cleary S.F., Cao G., Liu L.M. Effects of isothermal 2,45 GHz microwave radiation on the mammalian cell cycle: Comparison with effects of isothermal

27 MHz radiofrequency radiation exposure. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39: 167-173, 1996.

Close A.H., Guo T.L., Shenker B.J. Activated human T lymphocytes exhibit reduced susceptibility to methylmercury chloride-induced apoptosis. *Toxicol. Sci.* 49 (1): 68-77, 1999.

Cohen M.M., Kunska A., Astemborski J.A., McCulloch D. y Paskewitz D.A. Effect of low-level, 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells: I. Mitotic rate and chromosome breakage in human peripheral lymphocytes. *Bioelectromagnetics* 7: 415-423, 1986a.

Cohen M.M., Kunska A., Astemborski J.A., McCulloch D. y Paskewitz D.A. The effect of low-level, 60 Hz electromagnetic fields on human lymphoid cells: II. Sister-chromatid exchanges in peripheral lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. *Mutation Res.* 172: 177-184, 1986b.

Coogan T.P., Bare R.M., Waalkes M.P. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113 (2): 227-333, 1992.

Cook M.R., Graham C., Cohen H.D., Gerkovich M.M. A replication study of human exposure to 60 Hz fields: effects on neurobehavioural measures. *Bioelectromagnetics.* 13 (4): 261-285, 1992.

Cooper C.M., Gillespie W.B. Arsenic and mercury concentrations in major landscape components of an intensively cultivated watershed. *Environmental Pollution.* 111 (1): 67-74, 2001.

Cossariza A., Monti D., Sola P., Moschini G., Cadossi R., Bersani F., Franceschi C. DNA repair after gamma irradiation in lymphocytes exposed to low-frequency pulsed electromagnetic fields. *Radiat. Res.* 118 (1): 161-168, 1989.

Council of the European Communities. Resolution of 25 January 1988 on a community action programme to combat environmental pollution by cadmium. *Official Journal C* 030, 04/02/1988.

Cridland N.A. Electromagnetic fields and cancer: A review of relevant cellular studies. Report of the National Radiological Protection Board, United Kingdom, NRPB-R256, 1993.

Cridland N.A., Cragg T.A., Hayloxk R.G., Saunders R.D. Effects of 50 Hz magnetic field exposure on the rate of DNA synthesis by normal human fibroblast. *Int. J. Radia.Biol.* 69 (4): 503-511, 1996.

Czerska E.M., Elson E.C., Davis C.C., Swicord M.L. Effects of continuous and pulsed 2450 MHz radiation exposure on spontaneous transformation of human lymphocytes in vitro. *Bioelectromagnetics.* 13: 247-259, 1992.

Dally H., Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18 (5):1021-1026, 1997.

Davanipour Z., Sobel E., Bowman J.D., Qian Z., Will A.D. Amiotrophic lateral sclerosis and occupational exposure to electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 18: 28-35, 1997.

De Bruyn L., De Jager L., Kuyl J.M. The influence of long-term exposure of mice to randomly varied power frequency magnetic fields on their nocturnal melatonin secretion patterns. *Environ. Res.* 85 (2): 115-121, 2001.

Denny M.F., Atchison W.D. Mercurial-induced alterations in neuronal divalent cation homeostasis. *Neurotoxicology.* 17 (1): 47-61, 1996.

Dietz R., Riget F., Cleemann M., Aarkrog A., Johansen P., Hansen J.C. Comparison of contaminants from different trophic levels and ecosystems. *Sci. Total. Environ.* 245 (1-3): 221-231, 2000.

De Seze R., Ayoub J., Peray P., Miro L., Touitou Y. Evaluation in humans of the effects of radiocellular telephones on the circadian patterns of melatonin secretion a chronobiological rhythm marker. *J. Pineal. Res.* 27: 237-242, 1999.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N° C 205/440, Documento N° A3-0238/94, del 5 de mayo de 1994.

Dieter M.P., Boorman G.A., Jameson C.W., Eustis S.L., Uraih L.C. Development of renal toxicity in F344 rats gavaged with mercuric chloride for 2 weeks, or 2, 4, 6, 15, and 24 months. *J. Toxicol. Environ. Health.* 36 (4): 319-40, 1992.

Drake P.L., Rojas M., Reh C.M., Mueller C.A., Jenkins F.M. Occupational exposure to airborne mercury during gold mining operations near El Callao, Venezuela. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 74 (3): 206-212, 2001.

- Druet P., Pelletier L. Manifestation of immunologic origin produced by toxic compounds. *Rev. Prat.* 41 (21): 2078-2084, 1991.
- Dudley R.E., Svoboda D. J., Klaassen C.D. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 65 (2): 302-313, 1982.
- Dudley R.E., Gammal L.M., Klaassen C.D. Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77 (3): 414-426, 1985.
- Dutta S.K., Subraimanian P., Ghosh B., Parshad R. Microwave radiation induced calcium ion efflux from human neuroblastoma cells in culture. *Bioelectromagnetics* 5: 71-78, 1984.
- E.C. "European Commission". Public health and safety at work, non-ionizing radiation sources, exposure and health effects. In McKinlay. Directorate General V Employment, Public relations and Social Affairs Luxembourg European Commission, 1996.
- Ehrlich R. Electricity and magnetism simulations. New York. 184 pp. Ed: John Wiley and Sons, 1995.
- Elinder C.G., Kjellström T., Hogstedt C., Anderson K., Spang G. Cancer mortality of cadmium workers. *Br. J. Ind. Med.* 42: 651-655, 1985.
- El-Fawal H.A., Waterman S.J., De Feo A., Shamy M.Y. Neuroimmunotoxicology: humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms. *Environ. Health. Perspect.* 107 (5): 767-775, 1999.
- Elghany N.A., Schumacher M.C., Slattery M.L., West D.W., Lee J.S. Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology.* 1 (2): 107-115, 1990.
- Elwood J.M. A critical review of epidemiologic studies of radiofrequency exposure and human cancers. *Environ. Health Perspect.* 107: 155-160, 1999.
- Fahmy M.A., Aly F.A.E. In vivo and in vitro studies on the genotoxicity of cadmium chloride in mice. *J. Appl. Toxicol.* 20 (3): 231-238, 2000.
- Farrell J.M., Litovitz T.L., Penafiel M., Montrose C.J., Doinov P. Barber M., Brown K.M., Litovitz T.A. The effect of pulsed and sinusoidal magnetic

fields on the morphology of developing chick embryos. *Bioelectromagnetics*. 18(6): 431-438, 1997.

Feychting M., Ahlbom A. Magnetic fields and cancer in children residing near Swedish high-voltage power lines. *Am. J. Epidemiol.* 138: 467-481, 1993.

Feychting M., Forssen U., Floderus B. Occupational and residential magnetic field exposure and leukemia and central nervous system tumors. *Epidemiol* 8: 384-389, 1997.

Fiala J., Hrubá D., Rezl P. Cadmium and zinc concentrations in human placentas. *Cent. Eur. J. Public Health*. 6 (3): 241-248, 1998.

Finer J.T., Simmons R.M., Spudich J.A. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*. 368 (98-99): 113-119, 1994.

Floderus B., Persson T., Stenlund C., Wennberg A., Ost A., Knave B. Occupational exposure to electromagnetic fields in relation to leukemia and brain tumors: a case-control study in Sweden. *Cancer causes and control*. 4 (5): 465-476, 1993.

Flórez J., Armijo J. A., Mediavilla A. *Farmacología humana*. Barcelona, Masson, 1999.

Foote R.H. Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reprod. Toxicol.* 13 (4): 269-277, 1999.

Foster K.R., Schwan H.P. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17 (1): 25-104, 1989.

Franchi E., Loprieno G., Ballardin M., Petrozzi L., Migliore L. Citogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mutat. Res.* 320 (1-2): 23-29, 1994.

Frei M.R., Berger R.E., Dusch S.J., Guel V., Jauchem J.R., Merritt J.H., Stedham M.A. Chronic exposure of cancer-prone mice to low-level 2450 MHz radiofrequency radiation. *Bioelectromagnetics*. 19 (1): 20-31, 1998.

Frey A.H. Headaches from cellular telephones: are they real and what are the implications? *Environ. Health. Perspect.* 106 (3): 101-103, 1998.

Friberg L. Proteinuria and emphysema among workers exposed to cadmium and nickel dust in a storage battery plant. *Proc. Int. Cong. Ind. Med.* 9: 641-644, 1948.

Friberg L., Kjellström T., Nordberg G.F. Cadmium. In: Friberg L., Nordberg G, Vouk VB (eds) Handbook on the toxicology of metals, vol 2, 2nd edn. Elsevier, New York, pp 130-184, 1986.

Fu J.Y., Huang X.S., Zhu X.Q. Study on peripheral blood lymphocytes chromosome abnormality of people exposed to cadmium in environment. Biomed. Environ. Sci. 12 (1): 15-19, 1999.

Fulton J.P., Cobb S., Preble L., Leone L., Foman E. Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode-Islands. Am. J. Epidemiol. 111: 292-296, 1980.

Futatsuka M., Jutabi T., Shono M., Fukuda Y., Ushijima K., Inaoka T., Nagano M. Y col. Health surveillance in the population living in a methyl mercury polluted area over a long period. Environ. Res. 83 (2): 150-161, 2000.

Gabriel C., Gabriel S., Corthout E. The dielectric properties of biological tissues: I. Literature Survey. Phys. Med. Biol. 41 (11): 2231-2249, 1996a.

Gabriel S., Lau R.W., Gabriel C. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. Phys. Med. Biol. 41 (11): 2251-2269, 1996b.

Gabriel S., Lau R.W., Gabriel C. The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. Phys. Med. Biol. 41 (11): 2271-2293, 1996c.

Garber H.J., Oldendorf W.H., Braun L.D. Lufkin R.B. MRI gradient fields increase brain nannitol space. Magn. Reson. Imaging. 7 (6): 605-610, 1989.

García Arribas O., Pérez Calvo M., Nuñez García M., Sebastián J.L., Martínez G., Rodríguez L.P. und Ribas Ozonas B. Proliferation und Mikronucleus in peripheren menschlichen Lymphocyten in Gegenwart von Kadmium im ELF Magnetfeld. M. Anke, W. Arnhold, et al. (eds.). Editorial: Verlag Harald Schubert, Leipzig, Alemania. Mengen und Spurenelemente. 1: 9-16, 1998.

García Arribas O., Pérez Calvo M., Ribas Ozonas B. Electroforesis capilar de metalotioneína en hígado de mamífero como proteína bioindicadora de la contaminación ambiental por residuos metálicos. Proceedings of the "V Congreso Internacional de Química de la ANQUE" Solid, Liquid and Gaseous Wastes. Their best destination (III). 2: 347-356, 1999a.

García Arribas O., Pérez Calvo M., Ribas B., Sebastián J.L., Muñoz S., Sancho M., Miranda J.M., Rodríguez L.P., Escribano J.M. Dieletrische Zulässigkeit und Leitfähigkeit der Gewebe Schwermetallbehandelter Ratten. Editorial: Verlag Harald Schubert, Leipzig, Alemania. Mengen- und Spürem-Elemente. 1: 940-947, 1999b.

García Arribas O., Pérez Calvo M., Ribas Ozonas B. Electroforesis Capilar de metalotioneína en hígado de mamífero como proteína bioindicadora de la contaminación ambiental por cadmio y plomo. En Globalización Ambiental. Perspectivas Agrosanitarias Urbanas. 747-755, 2000a.

García Arribas O., Pérez Calvo M., Sebastián J. L., Muñoz S., Sancho Mmiranda J.M., Escribano J. M., Rodríguez L. P., Ribas B. Effects of heavy metals on dielectrical properties of tissues at microwave frequencies. John Libbey Eurotext, Paris, France. Metal Ions in Biology and Medicine. 6: 147-149, 2000b.

García Arribas O., Pérez Calvo M., Ribas B. Efecto del campo electromagnético de muy baja frecuencia (50 Hz) en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Rev. Toxicol. 18 (3): 154-155, 2001.

García-Sagredo J.M., Cabello J.M.P., Monteagudo J.L. Effects of low-level 50 Hz electromagnetic fields on human chromosomes *in vitro*. Mutation Res. 234: 385-386, 1990.

Gerrad P.M., St. Louis V.L. The effects of experimental reservoir creation on the bioaccumulation of methylmercury and reproductive success of tree swallows (*Tachycineta bicolor*). Environ. Sci. Technol. 35 (7): 1329-1338, 2001.

Glaser U., Hochrainer D., Otto F.J. Oldiges H. Carcinogenicity and toxicity of four cadmium compounds inhaled by rats. Chem. Environ. Toxicol. 27: 153-162, 1990.

Goldsmith J. Epidemiologic evidence of radiofrequency radiation (microwave) effects on health in military, broadcasting and occupational studies. Int. J. Occup. Med. Environ. Health. 1: 47-57, 1995.

Goldsmith J.R. Epidemiologic evidence relevant to radar (microwave) effects. *Environ. Health Perspect.* 105 (6): 1579-87, 1997.

Gorczyńska E., Wegrzynowicz R. Effect of chronic exposure to static magnetic field upon the K⁺, Na⁺, and chlorides concentrations in the serum of guinea pigs. *J. Hyg. Epidemiol. Immunol.* 30 (2): 121-126, 1986.

Goyer R.A. Toxic effect of metals. In: Amdur M.O, Doull J., Klaassen C.D. (eds). *Casarett and Doull's toxicology, the basic science of poisons*, 4th edn. Mc Graw-Hill Pergamon, New York , pp 623-680, 1991.

Goyer R.A., Cherian M.G. Role of metallothionein in human placenta and rats exposed to cadmium. In: Nordberg G.F., Herber R.F. M., Alessio L. (eds). *Cadmium in the human environment*. IARC, Lyon, pp 239-247, 1992.

Graham C., Cook M.R., Cohen H. D., Gerkovich M.M. Dose response study of human exposure to 60 Hz electric and magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 15 (5): 447-463, 1994.

Graham C., Cook M.R., Riffle D.W., Gerkovich M.M., Cohen H.D. Nocturnal melatonin levels in human volunteers exposed to intermittent 60 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 17 (4): 263-273, 1996.

Graham C., Cook M.R., Riffle D.W. Human melatonin during continuous magnetic field exposure. *Bioelectromagnetics.* 18 (2): 166-17, 1997.

Graham C., Cook M.R. Human sleep in 60 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 20 (5): 277-283, 1999.

Grandjean P., White R.F. Effects of methylmercury exposure on neurodevelopment. *JAMA.* 281 (10): 896-897, 1999.

Greenland S. Estimation of population attributable fractions from fitted incidence ratios and exposure survey data, with an application to electromagnetic fields and childhood leukaemia. *Biometrics.* 57 (1): 182-188, 2000.

Grissom C.B. Magnetic field effects in biology: a survey of possible mechanisms with emphasis on radical pair recombination. *Chem. Rev.* 95: 3-24, 1995.

Guénel P, Raskmark R, Anderson JB, Lynge E. Incidence of cancer in persons with occupational exposure to electromagnetic fields in Denmark. *Brit. J. Industr. Med.* 50: 758-764, 1993.

Guyton Arthur C. Anatomía y fisiología del sistema nervioso: neurociencia básico. Buenos Aires. Panamericana, 1997.

Han C., Wu G., Yin Y., Shen M. Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxicity assays. *Food. Chem. Toxicol.* 30 (6): 521-524, 1992.

Hand J.W., Lau R.W., Langendijk J.J., Burl M. and Young I.R. Electromagnetic and thermal modeling of SAR and temperature fields in tissue due to and RF decoupling coil. *Magn. Reson. Med.* 42 (1): 183-192, 1999.

Hardell L., Nasman A., Pahlson A., Hallquist A. Hansson-Mild K. Use of cellular telephones and the risk for brain tumours: a case-control study. *Int. J. Oncol.* 15 (1): 113-116, 1999.

Hintenlang D.E. Synergistic effects of ionizing radiation and 60 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics.* 14: 545-551, 1993.

Hiratsuka H., Satoh S., Satoh M., Nishijima M., Katsuke Y., Nakagawa J., Sumiyoshi M. y col. Tissue distribution of cadmium in rats given minimum amounts of cadmium-polluted rice or cadmium chloride for 8 months. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160 (2): 183-191, 1999.

Hinsenkamp M., Jercinovic A., De Graef C., Wilaert F., Heenen M. Effects of low frequency pulsed electrical current on keratinocytes *in vitro*. *Bioelectromagnetics.* 18 (3): 250-254, 1997.

Hocking B., Gordon I.R., Grain M.L., Hatfield G.E. Cancer incidence and mortality and proximity to TV towers. *Med. J. Australia* 165: 601-605, 1996.

Hultberg B., Andersson A., Isaksson A. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology.* 126 (3): 203-212, 1998.

Hussain S., Rodgers D.A., Duhart H.M., Ali S.F. Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effects on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *J. Environ. Sci. Health B.* 32 (3): 395-409, 1997.

Hussain S., Atkinson A.L., Thompson S.J., Khan A.T. Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *J. Environ. Sci. Health B.* 34 (4): 645-660, 1999.

IARC. "International Agency Research Cancer" Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *Intl. Agency Res. Cancer*, vol 58. Lyon France, pp 119-238, 1993.

IEEE. "Institute of Electrical and Electronic Engineers". Standard for safety levels with respect to human exposure to radiofrequency electromagnetic fields. Coordinating Committee 28. New York, ANSI/IEEE C95.1, 1992.

IFCC. "Federación Internacional de Química Clínica". Approved Recommendation on IFCC Methods for Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes, 1994.

Ikeda M., Zhang Z.W., Moon C.S., Shimbo S., Watanabe T., Nakatsuka H., Matsuda-Igonuchi N. y col. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 73 (1): 15-25, 2000.

Imaida K., Taki M., Yamaguchi T., Ito T., Watanabe S., Wake K., Aimoto A. et al. Lack of promoting effects of the electromagnetic near-field used for cellular phones (929.2 MHz) on rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay. *Carcinogenesis.* 19 (2): 311-4, 1998.

Iniesta M.P., Ribas B., Bondia S., Pelaez M.T., Beneit J.V., Lorenzo P. Partial purification and biological activity of liver metallothionein. *Rev. Esp. Fisiol.* 41 (4): 431-436, 1985.

Inskip P. y cols. Uso de teléfonos celulares y cáncer de cerebro. *NEJM.* 344: 79-86, 2001.

Jagetia G.C., Adiga S.K. Cadmium chloride induces dose-dependent increases in the frequency of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 306 (1): 85-90, 1994.

Johansen C., Koch-Henriksen N. Rasmussen S., Olsen J.H. Multiple sclerosis among utility workers. *Neurology.* 52 (6): 1279-1282, 1999.

John T.M., Liu G.Y., Brown G.M. 60 Hz magnetic field exposure and urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in the rat. *Bioelectromagnetics.* 19 (3): 172-80, 1998.

Johnson C.C., Spitz M.R. Childhood nervous system tumours: An assessment of risk associated with paternal occupations involving use, repair or manufacture of electrical and electronic equipment. *Int. J. Epidemiol.* 18: 756-762, 1989.

Johnson M.D., Anderson B.D. In vitro models of the blood brain barrier to polar permeants: comparison of transmonolayer flux measurements and cell uptake kinetics using cultured cerebral capillary endothelial cells. *J. Pharm. Sci.* 88 (6): 620-625, 1999.

Jolliet P.R., Tillement J.P. Mechanisms of nutrient and drug transfer through the blood-brain-barrier and their pharmacological changes. *Encephale.* 25 (2): 135-45, 1999.

Jones R., Lapp T, Wallace D. Locating and Estimating Air Emission from Sources of Cadmium and Cadmium Compounds, Prepared by Midwest Research Institute for the U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air and Radiation, Report EPA- 453/R-93-040, 1993.

Joseph P., Muchnok T.K., Klishis M.L., Roberts J.R., Antonini J.M., Whong W.Z., Ong T.M. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: Role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 61 (2): 295-303, 2001.

Juutilainen J., Lang S. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields: Introduction and Overview. *Mutat. Res.* 24 (4) 245-254, 1998.

Kasama H., Itoh K., Omata S., Sugano H. Differential effects of methylmercury on the synthesis of protein species in dorsal root ganglia of the rat. *Arch. Toxicol.* 63: 226-230, 1989.

Kazantzis G., Lam T.H., Sullivan K. Mortality of cadmium exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health.* 14: 213-217, 1988.

Keep R.F., Ulanski L.J., Xiang J., Ennis S.R., Lorriss-Beltz A. Blood brain barrier mechanisms involved in brain calcium and potassium homeostasis. *Brain Res.* 815 (2): 200-205, 1999.

Kerper L.E., Ballatori N., Clarkson T.W. Methylmercury transport across the blood brain barrier by an amino acid carrier. *Am. J. Physiol.* 262 (5): 761-765, 1992.

- Khalil A.M. y Qassem W. Cytogenetic effect of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and cell kinetics. *Mutat. Res.* 247:141-146, 1991.
- Kheifets L., Kelsey J. Epidemiological studies of electric and magnetic fields and cancer. In: Lin, JC. Ed. *Advances in electromagnetic fields and living systems*. Plenum: New York, p 29-62, 1997.
- Kido Y., Tamai I., Uchino H., Suzuki F., Sai Y., Tsuji A. Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporters LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. *J. Pharm. Pharmacol.* 53 (4): 497-503, 2001.
- Kikkawa U., Kishimoto A., Nishizuka Y. The protein kinase C family: Heterogeneity and its implications. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 31-44, 1989.
- Kolodynski A.A., Kolodynska V.V. Motor and psychological functions of school children living in the area of the Skrunda radio locations station in Latvia. *Sci. Total Environ.* 180: 87-91, 1996.
- Kostial K., Simonovic I., Rabar I., Blanusa M., Landeka M. Age and intestinal retention of mercury and cadmium in rats. *Environ. Res.* 31 (1): 111-115 1983.
- Krewski D., Byus C.V., Glickman B.W., Lotz W.G., Mandeville R., Mc.Bride M.L., Prato F.S., Weaver D.F. Potential health risks of radiofrequency fields from wireless telecommunication devices. *J. Toxicol. Environ. Health. Part.B.* 4 (1). 1-143, 2001.
- Kuwabara T., Yuasa T., Hidaka K., Igarashi H., Kaneko K., Miyatake T. The observation of blood brain barrier of organic mercury poisoned rat: a Gd-DTPA enhanced magnetic resonance study. *No.To. Shinkei.* 41 (7): 681-685, 1989.
- Kwee S., Rasmak P. Changes in cell proliferation due to enviromental non – ionizing radiation. *ELF electromagnetic fileds. Bioelectrochem. Bioenerg.* 36: 109-114, 1995.
- Lacy-Hulbert A., Wilkins R.C., Hesketh T.R., Metcalfe J.C. No effects of 60 Hz electromagnetic fields on MYC or beta-actin expression in human leukemic cells. *Radiation. Res.* 144 (1): 9-17, 1995.

Lafuente A., Márquez N., Pérez-Lorenzo M., Pazo D., Esquifino A.I. Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats. *Exp. Biol. Med.* 226 (6): 605-611, 2001.

Lagrange P., Romero I.A., Minn A., Revest P.A. Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 27 (5-6): 667-672, 1999.

Lai H., Carino M.A., Horita A, Guy A.W. Low-level microwave irradiation and central cholinergic activity: a dose-response study. *Bioelectromagnetics.* 10 (2): 203-208, 1989.

Lai H., Horita A., Guy A.W. Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in the rat. *Bioelectromagnetics.* 15 (2): 95-104, 1994.

Lai H., Singh N.P. Acute low-intensity microware exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics.* 16: 207-210, 1995.

Lai H., Singh N.P. Single and double strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int. J. Radiation Bio.* 69: 513-521, 1996.

Land D.V., Campbell A.M. A quick accurate method for measuring the microwave dielectric properties of small tissue samples. *Phys. Med. Biol.* 37 (1): 183-192, 1992.

Landry P.S., Sadasivan K.K., Marino A.A., Albright J.A. Electromagnetic fields can affects osteogenesis by increasing the rate of differentiation. *Clin. Orthop.* 338: 262-270, 1997.

Langford N., Ferner R. Toxicity of mercury. *J. Hum. Hypertens.* 13 (10): 651-656, 1999.

Latinwo L.M., Ikediobi C.O., Singh N.P., Sponholtz G., Fasanya C., Riley L. Comparative studies of *in vivo* genotoxic effects of cadmium chloride in rat brain, kidney and liver cells. *Cell. Mol. Biol. Noisy le grand.* 43 (2): 203-210, 1997.

Lau S., Mohamed M., Yen A.T., Suut S. Accumulation of heavy metals in freshwater molluscs. *Sci. Total. Environ.* 214: 113-121, 1998.

Lauwerys R., Amery A., Bernard A., Bruaux P., Buchet J.P., Claeys F., De-Plaen P., Ducoffre G., Fagard R., Lijnen P., et al. Health effects of environmental exposure to cadmium: objectives, design and organization of the Cadmibel Study: a cross-sectional morbidity study carried out in Belgium from 1985 to 1989. *Environ. Health Perspect.* 87: 283-289, 1990.

Lee G.U., Chirisey L.A., Colton R.J. Direct measurement of the forces between complementary strands of DNA. *Science* 266 (5186): 771-773, 1994.

Leeuwen y col. *Phys. Med. Biol.* 44: 2367-2370, 1999.

Levine R.L., Dooley J.K., Bluni T.D. Magnetic field effects on spatial discrimination and melatonin levels in mice. *Physiol. Behav.* 58 (3): 535-537, 1995.

Liburdy R.P., Löscher W. Laboratory studies on extremely low frequency (50/60 Hz) magnetic fields and carcinogenesis. In: R.G. Stevens, B.W. Wilson and L. E. Anderson eds. *The Melatonin Hypothesis*. Columbus, Battelle Press, 1997.

Liddle C.G., Putnam J.P., Huey O.P. Alteration of life span of mice chronically exposed to 2.45 GHz CW microwaves. *Bioelectromagnetics.* 15 (3): 177-181, 1994.

Linnet M.S., Hatch E.E., Kleinerman R.A. Robinson L.L., Kaune W.T., Friedman D.R., Severson R.K. y col. Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. *N. Engl. J. Med.* 337: 1-7, 1997.

Litovitz T.A., Krause D., Mullins J.M. Effect of coherence time of the applied magnetic field on ornithine decarboxylase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 178 (3): 862-865, 1991.

Liu D.S., Astumian R.D., Tsong T.Y. Activation of Na⁺ y K⁺ pumping modes of (Na,K)-ATPase by oscillating electric fields. *J. Biol. Chem.* 265: 7260-7267, 1990.

Liu J., Liu Y., Habeebu S.S., Klaassen C.D. Metallothionein-null mice are highly susceptible to the hematotoxic and immunotoxic effects of chronic CdCl₂ exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 159 (2): 98-108, 1999.

Löscher W., Mevissen M. Animal studies on the role of 50/60 Hz magnetic fields in carcinogenesis. *Life Sci.* 54: 1531-1543, 1994.

Loschinger M., Thumm S., Hammerle H., Rodemann H.P. Stimulation of protein kinase A activity and induced terminal differentiation of human skin fibroblasts in culture by low-frequency electromagnetic fields. *Toxicol. Lett.* 96: 369-376, 1998.

Lu Y., Cui H., Yu J., Mashimo S. Dielectric properties of human fetal organ tissues at radio frequencies. *Bioelectromagnetics.* 17 (5): 425-426, 1996.

Luben R.A. In vitro systems for study of electromagnetic effects on bone and connective tissue. In Carpenter, DO, and Ayrapetyan, S.eds. *Biological Effects of Electric and Magnetic Fields.* San Diego CA: Academic Press. (vol. 2), 1994.

Lund B.O., Miller D.M., Woods J.S. Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 42: 181-187, 1991.

Lyle D.B., Scheter P., Adey W.R., Lundak R.L. Suppression of T-lymphocyte cytotoxicity following exposure to sinusoidally amplitude modulated fields. *Bioelectromagnetics.* 4: 281-292, 1983.

Lyskov E.B., Juutilainen J., Jousmaki V., Partanen J., Medvedev S., Hanninen O. Effects of 45 Hz magnetic fields on the functional state of the human brain. *Bioelectromagnetics.* 14: 87-95, 1993a.

Lyskov E.B., Juutilainen J., Jousmaki V., Hanninen O., Medvedev S., Partanen J. Influence of short-term exposure of magnetic field on the bioelectrical processes of the brain and performance. *International Journal of Psychophysiology.* 14: 227-231, 1993b.

Maes A, Collier M, Slaets D, Verschaeve L. 954 MHz microwaves enhance the mutagenic properties of mitomycin C. *Environ. Mol. Mutagen.* 28 (1): 26-30, 1996.

Mahaffey K.R. Methylmercury: A new look at the risks. *Public. Health. Rep.* 114 (5): 397-415, 1999.

Maier W.E., Costa L.G. Na⁺ /K⁺ ATPase in rat brain and erythrocytes as a possible target and marker, respectively, for neurotoxicity: studies with chlordecone, organotins and mercury compounds. *Toxicol. Lett.* 51 (2): 175-188, 1990.

Malyapa R.S., Ahern E.W., Straube W.L., Moros E.G., Pickard W.F., Roti-Roti J.L. Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation. *Radiat. Res.* 148 (6): 608-17, 1997.

Mann K., Röschke J. Effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on human sleep. *Neuropsychobiology.* 33 (1): 41-47, 1996.

Margonato V., Nicolini P., Conti R., Zecca L., Veicsteinas A. Veicsteinas A., Cerretelli P. Biologic effects of prolonged exposure to ELF electromagnetic fields in rats. II. 50 Hz electric fields. *Bioelectromagnetics.* 16 (6): 343-55, 1995.

Marrazini A., Betti C., Bernacchi F., Barrai I., Barale R. Micronucleus test and metaphase analysis in mice exposed to known and suspected spindle poisons. *Mutagenesis.* 9 (6): 505-515, 1994.

Mathiessen T., Ellingsen D.G., Kjuus H. Neuropsychological effects associates with exposure to mercury vapor among former chloralkali workers. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 25 (4): 342-50, 1999.

McCann J., Dietrich F., Rafferty C. y Marin A.O. A critical review of the genotoxic potential of electric and magnetic fields. *Mutat. Res.* 297: 61-95, 1993.

McCann J., Dietrich F., Rafferty C. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutation Research.* 411 (1): 45-86, 1998.

McCann J., Kavet R., Rafferty C. Assessing the potential carcinogenic activity of magnetic fields using animals models. *Environ. Health. Perspect.* 108 (1): 79-100, 2000.

Mercola J., Klinghardt D. Mercury toxicity and systemic elimination agents. *J. Nutr. Environ. Med.* 11 (1): 53-62, 2001.

Mevisen M., Stamm A., Buntenkötter S., Zwingelberg R., Wahnschaffe U., Löscher W. Effects of magnetic fields on mammary tumor development induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in rats. *Bioelectromagnetics.* 14 (2): 131-143, 1993.

Mevisen M., Kietzmann M., Löscher W. *In vivo* exposure of rats to weak alternating magnetic field increases ornithine decarboxylase activity in the mammary gland by a similar extent as the carcinogen DMBA. *Cancer Letters* 90: 207-214, 1995.

- Mevissen M., Haussler M., Loscher W. Alterations in ornithine decarboxylase activity in the rat mammary gland after different periods of 50 Hz magnetic field exposure. *Bioelectromagnetics*. 20 (6): 338-346, 1999.
- Mild y col. Documento del: National Institute for Working Life (Sweden), 1998.
- Minnema D.J., Cooper G.P., Greenland R.D. Effects of methylmercury on neurotransmitter release from rat brain synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 99: 510-521, 1989.
- Moller- Madsen B., Danscher G. Localization of mercury in CNS of the rat. Mercuric chloride (HgCl₂) per os. *Environ. Res.* 41 (1): 29-43, 1986.
- Morrow H. Cadmium, Metals, and Minerals Annual Review, The mining Journal Ltd. London, UK, 1997.
- Moulder J.E, Erdreich L.S., Malyapa R.S., Merritt J., Pickard W.F., Vijayalaxmi. Cell phones and cancer: what is the evidence for a connection? *Radiat. Res.* 151(5): 513-531, 1999.
- Mudryi I.V. Heavy metals in the soil-plant-man system (a review). *Gigiena I Sanitariya*. 1: 14-17, 1997.
- Müller K.O. Stecher M. EMV. Rohde & Schwarz GmbH & Co KG, February 1995.
- Murphy J.C., Kaden D.A., Warren J., Sivak A. Power frequency electric and magnetic fields: A review of genetic toxicology. *Mutation Res.* 296: 61-95, 1993.
- Muscat J., Malkin M., Thompson S., Shore R., Stellmann S., McRee D., Neugut A., Wynder E. Handhelds Cellular Telephone Use and Risk of Brain Cancer *JAMA* 2000. 284: 3001-3007, 2000.
- Myers G.J., Davidson P.W., Cox C., Sahmlaye C., Cernichiari E., Clarkson T.W. *Environ. Res.* 83 (3): 275-285, 2000.
- Nafziger J., Devevey L., Tricottet V., Guillosson J.J., Avelant G., Arock M. Investigation of the effects of 50 Hz magnetic fields on purified human hematopoietic progenitors. *Life Sci.* 61 (19): 1935-1946, 1997.

- Naganuma A., Anderson M.E., Meister A. Cellular glutathione as a determinant of sensitivity to mercuric chloride toxicity. Prevention of toxicity by giving glutathione monoester. *Biochem. Pharmacol.* 40 (4): 693-697, 1990.
- Nakajima H., Kishi T., Tsuchiya Y., Yamada H., Tajima S. Exposure of fibroblasts derived from keloid patients to low energy electromagnetic fields: preferential inhibition of cell proliferations, collagen synthesis, and transforming growth factor beta expression in keloid fibroblasts in vitro. *Ann. Plast. Surg.* 39 (5): 536-541, 1997.
- Nakashima K., Wakisaka T., Fujiki Y. Dose-response relationship of cadmium embryotoxicity in cultured mouse embryos. *Reprod. Toxicol* 1: 293-298, 1988.
- Nasca P.C., Baptiste M.S., MacCubbin P.A., Metzger B.B., Carlton K., Greenwald P., Armbrustmacher V.W. et al. An epidemiologic case-control study of central nervous system tumors in children and parental occupational exposures. *Am. J. Epidemiol.* 128: 1256-1265, 1988.
- Neubauer C., Phelan A.M., Kues H., Lange D.G. Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex. *Bioelectromagnetics.* 11 (4): 261-8, 1990.
- Neuwelt E.A., Abbott N.J., Drewes L., Smith Q.R., Couraud P.O., Chioca E.A., Audus K.L. y col. Cerebrovascular Biology and the various neural barriers: challenges and future directions. *Neurosurgery.* 44 (3): 604-608, 1999.
- Nopp P., Rapp E., Pfutzner H., Nakesch H., Ruhsam C. Dielectric properties of lung tissue as a function of air content. *Phys. Med. Biol.* 38 (6): 699-716, 1993.
- Nordberg M., Nordberg G.F. Toxicological aspects of metallothionein. *Cell. Mol. Biol. Noisy Le grand.* 46 (2): 451-463, 2000.
- Nordenson I, Hansson-Mild K, Nordström S, Sweins A y Birke E. Clastogenic effects in human lymphocytes of power frequency electric fields: *In vivo* and *in vitro* studies. *Radiat. Environ. Biophys.* 23: 191-201, 1984.
- Nordenson I, Hansson-Mild K, Andersson G., Sandström M. Chromosomal aberrations in human amniotic cells after intermittent exposure to fifty Hertz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 15: 293-301, 1994.

Nordström S. Reproductive hazards and chromosomal aberrations among workers at high voltage substations. Proc Int Seminar Biological Effects of Electromagnetic Fields in Relation to Evaluation of Health Hazards from Power Transmission Lines, Oslo, 1981.

Nordström S., Birke E. y Gustavsson L. Reproductive hazards among workers at high voltage substations. *Bioelectromagnetic* 4: 91-101, 1983.

Novelli E.L.B, Vieira E.P., Rodrigues N.L., Ribas B.O. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ. Res.* 79 (2): 102-105, 1998.

NRC. "National Research Council". Possible health effects of exposure to residential electric and magnetic fields. Washington: National Academy Press, 1996.

NRPB. "National Radiological Protection Board". Electromagnetic fields and the risk of cancer. Report of an advisory group on non-ionizing radiation. Documents of the NRPB 3 (1), 138 pp., 1992.

NRPB. "National Radiological Protection Board". Independent Expert Group on Mobile Phones. Mobile Phones and Health. Chairman Sir William Stewart. Chilton, UK, 2000.

Nuyts G.D., Verpooten G.F., De Broe M.E. Intestinal alkaline phosphatase as an indicator of effects on the S3 segment of the human proximal tubule. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30: 713-715, 1992.

Oberdöster G. Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 12: 523-537, 1986.

OECD. "Organization for Economic Co-operation and Development". Risk Reduction Monograph N° 5: Cadmium OECD Environment Directorate, Paris, France, 1994.

Ogura H., Takeuchi T., Morimoto K. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 340 (2-3): 175-182, 1996.

Ohnishi T., Maruyama T., Higashi S., Awazu S. Blood-brain barrier transport of L-tyrosine conjugates: A model study for the brain targeting using large neutral amino acid transport system. *J. Drug. Targeting.* 8 (6): 395-401, 2000.

- Okazaki Y., Namikawa K., Minami T. Studies of metals and metallothionein in tissue. *Yakugaku. Zasshi.* 120 (3): 282-289, 2000.
- Olsen J.H., Nielsen A., Schulgen O. Residence near high-voltage facilities and risk of cancer in children. *Brit. Med. J.* 307: 891-895, 1993.
- Osbakken M., Griffith J., Taczanowsky P. A gross morphologic, histologic, and blood chemistry study of adult and neonatal mice chronically exposed to high magnetic fields. *Magn. Reson. Med.* 3 (4): 502-517, 1986.
- Paile W., Jokela K., Koivistoinen A., Salomaa, S. Effects of 50 Hz sinusoidal magnetic fields and spark discharges on human lymphocytes in vitro. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 36: 15-22, 1995.
- Pamphlett R., Waley P. Uptake of inorganic mercury by the human brain. *Acta. Neuropathol. Berl.* 92 (5): 525-527, 1996.
- Pamphlett R., Slater M., Thomas S. Oxidative damage to nucleic acids in motor neurons containing mercury. *J. Neurol. Sci.* 159 (2): 121-126, 1998.
- Papatheofanis F.J., Papatheofanis B.J. Short-term effect of exposure to intense magnetic fields on hematologic indices of bone metabolism. *Invest. Radiol.* 24 (3): 221-223, 1989.
- Pardridge W.M. Blood brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem. Res.* 23 (5): 635-644, 1998.
- Pedersen M.B., Hansen J.C., Mulvad G., Pedersen H.S., Gregersen M., Dancher G. Mercury accumulations in brains from populations exposed to high and low dietary levels of methyl mercury. Concentration, chemical form and distribution of mercury in brain samples from autopsies. *Int. J. Circumpolar Health.* 58 (2): 96-107, 1999.
- Penafiel L.M., Litovitz T., Krause D., Desta A., Mullins J.M. Role of modulation on the effect of microwave on ornithine decarboxylase activity in L929 cells. *Bioelectromagnetics.* 18 (2): 132-141, 1997.
- Person B.R., Salford L.G., Brun A., Eberhardt J.L., Malmgren L. Increased permeability of the blood brain barrier induced by magnetic and electromagnetic fields. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 649: 356-358, 1992.

- Petersen R.C., Testagrossa P.A. Radio-frequency electromagnetic fields associated with cellular-radio cell-site antennas. *Bioelectromagnetics*. 13 (6): 527-42, 1992.
- Phelan A.M., Lange D.G., Kues H.A., Luty G.A. Modification of membrane fluidity in melatonin-containing cells by low level microwave radiation. *Bioelectromagnetics*. 13: 131-146, 1992.
- Pinot F., Kreps S.E., Bachelet M., Hainaut P., Bakonyi M., Polla B.S. Cadmium in the environment: Sources, mechanisms of biotoxicity, and biomarkers. *Rev. Environ. Health* 15: 299-323, 2000.
- Podd J.V., Whittington C.J., Barnes J. Do ELF magnetic fields affect human reaction time? *Bioelectromagnetics* 16: 317-323, 1995.
- Polk C.H., Postow E. *Biological effects of electromagnetic fields*, 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1996.
- Pollan M. Breast cancer, occupation and exposure to electromagnetic fields among swedish men. *American Journal of Industrial Medicine*. 39 (3): 276-285, 2001.
- Prato F.S., Frappier J.R., Shivers R.R., Kavaliers M., Zabel P., Drost D., Lee T.Y. Magnetic resonance imaging increases the blood-brain barrier permeability to 153-gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid in rats. *Brain Res*. 523: 301-304, 1990.
- Prato F.S., Wills J.M., Roger J., Frappier H., Drost D.J., Lee T.Y., Shivers R.R., Zabel P. Blood-brain barrier permeability in rats is altered by exposure to magnetic fields associated with magnetic resonance imaging at 1,5 T. *Microsc. Res. Tech*. 27 (6): 528-534, 1994.
- Preece A.W., Iwi G., Davies-Smith A., Wesnes K., Butler S., Lim E., Varey A. Effect of a 915-MHz simulated mobile phone signal on cognitive function in man. *Int. J. Radiat. Biol*. 75(4): 447-456, 1999.
- Privezentsev K.V., Sirota N.P., Gaziev A.I. The genotoxic effects of cadmium studied in vivo. *Tsitol. Genet*. 30 (3): 45-51, 1996.
- Prokai L. Peptide drug delivery into the central nervous system. *Prog. Drug. Res*. 51: 95-131, 1998.

Pu J.S., Chen J., Yang Y.H.G., Bai Y.Q. The effects of 3000 MHz microwave irradiation on electroencephalic energy and energy metabolism in mouse brain. *Electro-Magnetiobiology*. 16: 243-247, 1997.

Quig D. Cysteine metabolism and metal toxicity. *Altern. Med. Rev.* 3 (4): 262-270, 1998.

Ragan H.A., Buschbom R.L., Pipes M.J., Philips R.D., Kaune W.T. Hematologic and serum chemistry studies in rats exposed to 60 Hz electric fields. *Bioelectromagnetics*, 4 (1): 79-90, 1983.

Rajanna B., Hobson M., Haris L., Ware L., Chetty C.S. Effects of cadmium and mercury on Na^+/K^+ ATPase and uptake of ^3H -dopamine in rat brain synaptosomes. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 98 (5): 291-296, 1990.

Real Decreto 1066/2001 de 28 de septiembre. Reglamento que establece condiciones de protección del dominio público radioeléctrico, restricciones a las emisiones radioeléctricas y medidas de protección sanitaria frente a emisiones radioeléctricas.

Reitz J.R., Milford F.J., Christy R.W. Fundamentos de la teoría electromagnética. Versión en español de C. Martínez Ávila y J.L. Sebastián Franco. 641pp. Argentina. Addison-Wesley Iberoamericana, 1996.

Recomendación del Consejo de 12 de julio de 1999 relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos (0 Hz a 300 GHz).1999/519/CE. DOCE 30.7.1999. L1999/59.

Repacholi M.H., Cardis E. Criteria for EMF Health Risk Assessment. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 72 (3-4): 305-312, 1997.

Repacholi M.H. Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*. 19 (1): 1-19, 1998.

Repacholi M.H. Electromagnetic Hipersensitivity. An environmental Illness. WHO Fact Sheet N° XXX Draf 08-November, 2000.

Ribas B. Toxicología de Oligoelementos. Monografías Técnicas Ministerio Sanidad y Consumo. 8: 35-53, 1989.

Ribas B., García Arribas O., Pérez Calvo M., Novelli E.L.B., Rodríguez L.P. y Varela E. Industria, Campos Electromagnéticos y Salud. *Industria Farmacéutica*. 15: (2): 75-83, 2000a.

Ribas Ozonas B., García Arribas O., Pérez Calvo M., Rodríguez L.P. Efectos biomédicos de los campos electromagnéticos. [http://www. Hannover 2000.net/-tecnología/es/tecnología/proyectos/efectos_cem/largo.htm](http://www.Hannover2000.net/-tecnología/es/tecnología/proyectos/efectos_cem/largo.htm).

ExpoHannover 2000. Diciembre 2000b.

Ribas Ozonas, B., Castro González, M.D., García Arribas, O., Pérez Calvo, M., Santos Ruiz, A., Novelli, E.L.B., Núñez, M. Metalotioneína y medio ambiente. En: Debates sobre la salud en el siglo XXI, Pablo Gil Loyzaga, ed., Fundación General de la Universidad Complutense. Ayuntamiento de Madrid. 4: 351-357, 2001a.

Ribas, B., García Arribas, O., Pérez Calvo, M., Sebastián, J. L., Muñoz, S., Garrido, J.A. Determinación de la permitividad y conductividad eléctricas a la frecuencia de microondas de varios tejidos de ratas tratadas con cadmio. An. Real Acad. Farmacia. 67 (1): 15-25, 2001b.

Ribas B., García-Arribas O., Pérez-Calvo M., García-Férriz P. Some data on the comparison between the eucariotic cell electric activity and the electromagnetic hypersensitivity syndrome. In: Bezpieczeństwo elektryczne. ELSAF 2001. Politechnika Wroclawska. Wroclaw. 1: 148-155, 2001c.

Ribas, B., García Arribas, O., Pérez Calvo M., Vázquez M. Interrelationships between extremely low frequency magnetic fields (50 Hz) and chemical exposure on the blood brain barrier permeability. In: Bezpieczeństwo elektryczne. ELSAF 2001. Politechnika Wroclawska. Wroclaw. 1: 141-146, 2001d.

Robinette C.D., Silverman C., Jablon S. Effects upon health of occupational exposure to microwave radiation radar. Am. J. Epidemiol. 112: 39-53, 1980.

Rochat B., Audus K.L. Drug disposition and targeting. Transport across the blood-brain barrier. Pharm. Biotechnol. 12: 181-200, 1999.

Rodier P.M., Ashner M., Sager P.R. Mitotic arrest in the developing CNS after prenatal exposure to methylmercury. Neurobehav. Toxicol. Teratol. 6: 379-385, 1984.

Roels H.A., Van-Assche F.J., Oversteyns M., De-Groof M., Lauwerys R.R., Lison D. Reversibility of microproteinuria in cadmium workers with incipient tubular dysfunction after reduction of exposure. Am. J. Ind. Med. 31 (5): 645-652, 1997.

Roels H.A., Hoet P., Lison D. Usefulness of biomarkers of exposure to inorganic mercury, lead, or cadmium in controlling occupational and environmental risks of nephrotoxicity. *Ren. Fail.* 21(3-4): 251-262, 1999.

Rogers N. y col. En: *The Melatonin Hypothesis*. Stevens, Wilson y Anderson. Eds. Battelle Press, Columbus, Richland. 429, 1997.

Rosenthal M., Obe G. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens. *Mutation Res.* 210: 329-335, 1989.

Rosenzweig P.H. and Volpe S.L. Iron thermoregulation and metabolic rate. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 131-148, 1999.

Rossini S.R., Reimao R., Lefevre B.H., Medrado-Faria M.A. Chronic insomnia in workers poisoned by inorganic mercury: psychological and adaptative aspects. *Arq. Neuropsiquiatr.* 58 (1): 32-38, 2000.

Roti-Roti J.L. *Radiation Research* 152: 665-670, 1999.

Rubin L.L., Staddon J.M. The cell biology of the blood brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:11-28, 1999.

Ryan B.M., Mallett E., Johnson T.R., Gauger J.R., McCormick D.L. Developmental toxicity study of 60 Hz (power frequency) magnetic fields in rats. *Teratology.* 54: 73-83, 1996.

Sachs F. In *Cell Shape: Determinants, Regulation and Regulatory Role*. pp.63-92, 1989.

Saffer J.D. Thurston S.J. Cancer risk and electromagnetic fields. *Nature.* 375: 22-23, 1995.

Sager P.R. Doherty R.A., Rodier P.M. Morphometric analysis of the effects of methylmercury on developing mouse cerebellar cortex. *Toxicologist.* 2: 116, 1982.

Sahl J.D., Kelsh M.A., Greenland S. Cohort and nested case-control studies of hematopoietic cancers and brain cancer among electric utility workers. *Epidemiol.* 4: 104-114, 1993.

Salford L.G., Brun A., Sturesson K., Eberhardt J.L., Persson B.R. Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic

radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc. Res. Tech.* 27 (6): 535-42, 1994.

Salford L.G., Brun A., Persson B.R., Eberhardt J. Experimental studies of brain tumor development during exposure to continuous and pulsed 915 MHz radiofrequency radiation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 30: 313-318.

Sander R., Brinkmann J., Küne B. Laboratory studies on animals and human beings exposed to 50 Hz electric and magnetic fields. CIGRE, International Congress on Large High Voltage Electric Systems, Paris, CIGRE Paper 36-01, 1982.

Satoh H. Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds. *Ind. Health.* 38 (2): 153-164, 2000.

Saunders N.R., Habgood M.D., Dziegielewska K.M. Barrier mechanisms in the brain I. Adult brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 (1): 11-19, 1999a.

Saunders N.R., Habgood M.D., Dziegielewska K.M. Barrier mechanisms in the brain II. Immature brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 (2): 85-91, 1999b.

Savitz D.A., Wachtel H., Barnes F.A. John E.M. and Tvrdyk JG. Case control study of childhood cancer and exposure to 60 Hz magnetic fields. *Am. J. Epidemiol.* 128: 21-38, 1988.

Savitz D.A., Loomis D.P. Magnetic field exposure in relation to leukaemia and brain cancer mortality among electric utility workers. *Am. J. Epidemiol.* 128: 21-38, 1995.

Scarfi M.R., Lioi M.B., Zeni O., Della-Noce M., Franceschi C., Bersani F. Micronucleus frequency and cell proliferation in human lymphocytes exposed to 50 Hz sinusoidal magnetic fields. *Health Phy.* 76 (3): 244-250, 1999.

Schurz F., Sabater-Vilar M., Fink-Gremmels J. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: The role of metal-binding proteins. *Mutagenesis.* 15 (6): 525-530, 2000.

Schwan H.P. Dielectric properties of biological tissue and cells at RF and MW-frequencies. In: *Biological effects and dosimetry of nonionizing radiation.* Editor: Grandolfo, Michelson and Rindi, Plenum Press, New York and London, 195-211, 1983.

Sedlakova R., Shivers R.R., Del Maestro R.F. Ultrastructure of the blood brain barrier in the rabbit. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 31 (1): 149-61, 1999.

Selmaoui B., Touitou Y. Sinusoidal 50 Hz magnetic fields depress rat pineal NAT activity and serum melatonin. Role of duration and intensity of exposure. *Life Sciences* 57: 1351-1358, 1995.

Selmaoui B., Touitou Y. Acute exposure to 50 Hz magnetic field does not affect hematologic or immunologic functions in healthy young men. *Bioelectromagnetics*. 17: 364-372, 1996.

Selmaoui B., Lambrozo J., Touitou Y. Endocrine functions in young men exposed for one night to a magnetic field. A circadian study of pituitary, thyroid and adrenocortical hormones. *Life Sci.* 61 (5): 473-486, 1997.

Shaik Z.A., Smith J.C. Metabolism of orally ingested cadmium in humans. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 8: 569-574, 1980.

Shukla G.S., Hussain T, Chandra S.V. Possible role of regional superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: *in vivo* and *in vitro* studies in growing rats. *Life Sci.* 41: 2215-2221, 1987.

Sienkiewicz Z.J., Robbins L., Haylock R.G.E., Saunders R.D. Effects of prenatal exposure to 50 Hz magnetic fields on development in mice: 2. Postnatal development. *Bioelectromagnetics*. 15: 363-375, 1994.

Simko M., Dopp E., Kriehuber R. Absence of synergistic effects on micronucleus formation after exposure to electromagnetic fields and asbestos fibers *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 108 (1): 47-53, 1999.

Sin Y.M., Teh W.F. Effect of long-term uptake sulphide on thyroid hormones and glutathione in mice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 49: 847-854, 1992.

Skiberg K., Hansteen I.L., Vistnes A.I. Chromosome aberrations in lymphocytes of high-voltage laboratory cable slicers exposed to electromagnetic fields. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 19 (1): 29-34, 1993.

Spivey-Fox M.R. *Fred. Proc.* 42: 1726-1730, 1983.

Stark B., Carlstedt T., Cullheim S., Risling M. Developmental and lesion-induced changes in the distribution of the glucosa transporter Glut-1 in the central and peripheral nervous system. *Neurosci. Lett.* 131 (1): 74-84, 2000.

Staudenmayer H. Environmental Illness. Lewis Publishers, Washington D.C. ISBN 1-56670-305-0, 1999.

Stevens R.G. Davis S., Thomas D.B., Anderson L.E., Wilson B.W. Electric power, pineal function and the risk of breast cancer. The FASEB Journal 6: 853-860, 1992.

Stoeppler M. Cadmium. In: Merian E. (ed). Metals and their compounds in the environment. VCH, New York, pp 803-851, 1991.

Stohs S.J., Bagchi D., Hassoun E. Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 20 (2): 77-88, 2001.

Stollery B.T. Effects of 50 electric currents on mood and verbal reasoning skills. British Journal of Industrial Medicine 43: 339-349, 1986.

Stollery B.T. Effects of 50 Hz electric currents on vigilance on concentration. British Journal of Industrial Medicine 44: 111-118, 1987.

Stuchly M.A., Athey T.W., Stuchly S.S., Samaras G.M., Taylor G. Dielectric properties of animal tissues *in vivo* at frequencies 10 MHz-1 GHz. Bioelectromagnetics. 2 (2): 93-103, 1981.

Stuchly M.A. Biomedical concerns in wireless communications. Crit. Rev. Biomed. Eng. 26: 117-151, 1998.

Suarez J.I. Treatment of acute cerebral edema. Rev. Neurol. 32 (3): 275-281, 2001.

Sutter B.C., Billaudel B., Sutter-Dub M.T., Bellossi A. Effects of constant magnetic fields on the B-cells and insulin target cells in the rat. Aviat. Space. Environ. Med. 58 (6): 537-540, 1987.

Svedenstal B.M., Johansson K.J. Fetal loss in mice exposed to magnetic fields during early pregnancy. Bioelectromagnetics 16: 284-289, 1995.

Svoboda K., Block S.M. Force and velocity measured for single kinesin molecules. Cell. 77 (5): 773-784, 1994.

Szmigielski S. Cancer mortality in subjects occupationally exposed to high frequency (Radiofrequency and microwaves) electromagnetic radiation. Sci. Total Environ. 180: 9-17, 1996.

- Tanaka T., Naganuma A., Imura N. Role of gamma-glutamyltranspeptidase in renal uptake and toxicity of inorganic mercury in mice. *Toxicology*. 60 (3): 187-198, 1990.
- Tandon S.K., Singh S., Prasad S., Mathur N. Hepatic and renal metallothionein induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food. Chem. Toxicol.* 39 (6): 571-577, 2001.
- Tattersall J.E.H., Scott I.R., Wood S.J., Nettell J.J., Bevir M.K., Wang Z., Wang Z., Somarisis N.P., Che X. Effects of low intensity radiofrequency electromagnetic fields on electrical activity in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 904 (1): 43-53, 2001.
- Tenforde T.S. Interaction of ELF magnetic fields with living systems. In: *Biological effects of Electromagnetic Fields*, (Polk C.; Postow E. Eds.), CRC Press, Boca Ratón, 185-230, 1996.
- Terasaki T., Pardridge W.M. Targeted drug delivery to the brain (blood-brain barrier, efflux, endothelium, biological transport). 8 (6): 353-355, 2000.
- Thériault G., Goldberg M., Miller A.B., Armstrong B., Guenel P., Deadman J., Imernon E. y col. Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among electric utility workers in Ontario and Quebec, Canada, and France 1970-1989. *Am. J. Epidemiol.* 139 (6): 550-572, 1994.
- Thun-Battersby S., Westermann J., Loscher W. Lymphocyte subset analysis in blood, spleen and lymph nodes of female Sprague-Dawley rats after short or prolonged exposure to a 50 Hz 100-microT magnetic field. *Radiat. Res.* 152 (4): 436-443, 1999.
- Tofani S., Ferrara A., Anglesio G., Gilli G. Evidence for genotoxic effects of resonant ELF magnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 36: 9-13, 1995.
- Toler J.C., Shelton W.W., Frei M.R., Merritt J.H., Stedham M.A. Long-term, low-level exposure of mice prone to mammary tumors to 435 MHz radiofrequency radiation. *Radiat. Res.* 148 (3): 227-34, 1997.
- Tomenius L. 50 Hz electromagnetic environment and the incidence of childhood tumors in Stockholm country. *Bioelectromagnetics* 7: 191-207, 1986.

- Toroptsev I.V. Soldatova L.P. Pathomorphological reactions of the cerebral cortex nerve elements during treatment with an alternating magnetic field. *Arkh. Patol.* 43 (11): 33-36, 1981.
- Trillo M.A., Ubeda A., Blanchard J.P., House D.E., Blackman C.F. Magnetic fields at resonant conditions for the hydrogen ion affect neurite outgrowth in PC-12 cells: a test of the ion parametric resonance model. *Bioelectromagnetics.* 17(1): 10-20, 1996.
- Tynes T., Hannevik M., Andersen A., Vistnes A.I., Haldorsen T. Incidence of breast cancer in Norwegian female radio and telegraph operators. *Cancer. Causes. Control.* 7 (2): 197-204, 1996.
- Uckun F.M., Kurosaki T., Jin J., Jun X., Bolen J., Luben R.A. Exposure of B-lineage lymphoid cells to low energy electromagnetics fields stimulates Lyn kinase. *J. Biol. Chem.* 270: 27666-27670, 1995.
- Valjus J., Norppa H., Jarventaus H., Sorsa M., Nykuri E., Saloma S., Jarvinen P., Kajander J. Analysis of chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei among power linesmen with long-term exposure to 50 Hz electromagnetic fields. *Radiat. Environ. Biophys.* 32 (4): 325-336, 1993.
- Valberg P.A. Designing EMF experiments: what is required to characterize "exposure"? *Bioelectromagnetics.* 16 (6): 396-406, 1995.
- Valberg P.A., Kavet R., Rafferty C.N. Can low level 50/60 Hz electric and magnetic fields cause biological effect? *Radiat. Res.* 148: 2-21, 1997.
- Varga B., Paksy K., Naray M. Distribution of cadmium in ovaries, adrenals and pituitary gland after chronic administration in rats. *Acta. Physiol. Hung.* 78 (3): 221-226, 1991.
- Velizarov S., Raskmark P. and Kwee S. The effects of radiofrequency fields on cell proliferation are non-thermal. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48 (1): 177-180, 1999.
- Verkasalo P.K., Pukkal E., Hongisto M.Y., Valjus J.E., Jarvinen P.J., Heikkila K.V., Koskenvuo M. Risk of cancer in Finnish children living close to power lines. *Brite Med. J.* 307: 895-899, 1993.
- Verschaeve L., Maes A. Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. *Mutat. Res.* 410 (2): 141-165, 1998.

Villeneuve P.J., Agnew D.A., Miller A.B., Corey P.N., Purdham J.T. Leukemia in electric utility workers: the evaluation of alternative indices of exposure to 60 Hz electric and magnetic fields. *Am. J. Ind. Med.* 37 (6): 607-617, 2000.

Vijayalaxmi, Pickard W.F., Bisht K.S., Leal B.Z., Meltz M.L., Roti-Roti J.L., Straube W.L., Moros E.G. Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835.62 MHz, FDMA). *Radiat. Res.* 155 (1): 113-121, 2001.

Villanueva S.F., Botello A.V. Metal pollution in coastal areas of Mexico. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 157: 53-94, 1998.

Von Hippel A.R. Dielectric and waves. Cambridge Mass, The MIT Press. 284 pp. 1966.

Von Klitzing L. *Physica Medica.* April/June: 77-80, 1995.

Vorobyov V.V., Galchenko A.A., Kukushkin N.I., Akoev I.G. Effects of weak microwave fields amplitude modulated at ELF on EEG of symmetric brain areas in rats. *Bioelectromagnetics.* 18(4): 293-298, 1997.

Waalkes M.P., Oberdörster G. Cadmium carcinogenesis. In: Foulkes E.C. (ed) *Biological effects of heavy metals, vol II: metal carcinogenesis.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp 129-158, 1990.

Waalkes M.P., Rehm S. Carcinogenicity of oral cadmium in the male Wistar (WF/NCr) rat: effect of chronic dietary zinc deficiency. *Fund. Appl. Toxicol.* 19: 512-520, 1992.

Waalkes M.P., Rehm S. Chronic toxic and carcinogenic effects of cadmium in the male DBA/2Ncr and NFS/NCr mice: strain-dependent association with tumors of the hematopoietic system, injection site, liver and lung. *Fund. Appl. Toxicol.* 23: 21-31, 1994.

Walkees M.P. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg. Biochem.* 79 (1-4): 241-244, 2000.

Wei H., Qiu L., Divine K.K., Ashbaugh M.D., Mc Intyre L.C., Fernando Q., Gandolfi A.J. Toxicity and transport of three synthesized mercury-thiol-complexes in isolates rabbit renal proximal tubular suspensions. *Drug. Chem. Toxicol.* 22 (2): 323-341, 1999.

Wertheimer N. y Leeper E. Electrical wiring configurations in childhood cancer. *Am. J. Epidemiol.* 109: 272-284, 1979.

West R., Hinson W.G., Swicord M.L. Anchorage-independent growth with JB6 cells exposed to 60 Hertz magnetic fields. *Bioelectroche. Bioenerg.* 34: 39-43, 1994.

Wilkins J.R., Hundley V.D. Paternal occupational exposure to electromagnetic fields and neuroblastoma in offspring. *Am. J. Epidemiol.* 131: 995-1008, 1990.

Wilson A.K., Bhattacharyya M.H. Effects of cadmium on bone: an *in vivo* model for the early response. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145 (1): 68-73, 1997.

Wolpaw J.R., Seegal R.F., Dowman R. Chronic exposure of primates to 60 Hz electric and magnetic fields: I. Exposure system and measurements of general health and performance. *Bioelectromagnetics.* 10 (3): 277-288, 1989.

WHO (World Health Organization). Non ionizing Radiation Protection. WHO Regional Publications, Regional Office for Europe, Copenhagen, European Series núm. 30, 1991.

WHO. "World Health Organization". Environmental Health Criteria 134. Cadmium International Programme on Chemical Safety (IPCS) Monograph, 1992.

WHO. "World Health Organization". Electromagnetic fields (300 Hz - 300 GHz). United Nations Environment Programme (UNEP). International Radiation Protection Association (IRPA). Environ. Health Criteria 137. Geneva: WHO, 1993.

Wu R.Y., Chiang H., Shao B.J., Li N.G., Fu Y.D. Effects of 2.45-GHz microwave radiation and phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on dimethylhydrazine-induced colon cancer in mice. *Bioelectromagnetics.* 15 (6): 531-8, 1994.

Yannai S., Sachs K.M. Absorption and accumulation of cadmium, lead and mercury from foods by rats. *Fd. Chem. Toxic.* 31: 351-355, 1993.

Yasutake A., Nakano A., Hirayama K. Induction by mercury compounds of brain metallothionein in rats: Hg⁰ exposure induces long-lived brain metallothionein. *Arch. Toxicol.* 72 (4): 187-191, 1998.

Ye J., Wang S., Barger M., Castranova V., Shi X. Activation of androgen response element by cadmium: a potential mechanism for a carcinogenic effect of cadmium in the prostate. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19 (3): 275-280, 2000.

Yellon J. Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster. *Pineal Res.* 16 (3): 136-144, 1994.

Yin H., Wang D., Svodoba K., Landkock R., Block S.M., Gelles J. Transcription against an applied force. *Science.* 270: 1653-1657, 1995.

Zalups R.K., Lash L.H. Effect of uninephrectomy and mercuric chloride on renal glutathione homeostasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 962-970, 1990.

Zalups R.K. Autoradiographic localization of inorganic mercury in the kidneys of rats: effects of unilateral nephrectomy and compensatory renal growth. *Exp. Mol. Pathol.* 54: 10-21, 1991.

Zalups R.K., Barfuss D.W., Lash L.H. Disposition of inorganic mercury following biliary obstruction and chemically induced glutathione depletion: dispositional changes one hour after the intravenous administration of mercuric chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154 (2): 135-144, 1999.

Zalups R.K. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52 (1): 113-143, 2000.

Zheng W., Perry D.F., Nelson D.L., Aposhian H.V. Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals. *J. Neurochem.* 5 (8): 2188-2193, 1991.

Zimmermann B., Hentschel D. Effect of a static magnetic field (3,5T) on the reproductive behaviour of mice, on the embryo and fetal development and on selected hematologic parameters. *Digitale-Bilddiagn.* 7 (4): 155-161, 1987.