

## Estudios in vitro

Como las condiciones de laboratorio son más fáciles de configurar para estudios *in vitro*, y porque los sistemas biológicos parecen más simples y más estables para ser estudiados con este enfoque, hay una literatura muy voluminosa sobre las interacciones biológicas de la RF, que no tenemos intención de revisar aquí en detalle. Comentarios en profundidad han sido publicados recientemente por otros autores, y remitimos al lector a ellos (véase especialmente D'Inze de 2009; Marino, 2008a y 2008b; ICNIRP, 2009).

Los estudios *in vitro* tratan de responder a la cuestión fundamental que está en la raíz de todos los efectos biológicos potenciales de la RF, o sea, si estos efectos no se pueden demostrar de manera clara y sin lugar a dudas a el nivel de las moléculas o en preparados de células aisladas, no hay razón para continuar la investigación científica de estos efectos a otros niveles de complejidad en los organismos vivos.

D'Inze (2009) propone un modelo jerárquico, o en capas, en la interpretación de los resultados de acuerdo a estos niveles de complejidad, y que establece que:

*"Los modelos de interacción que tienen como objetivo evaluar las posibles consecuencias sobre la salud suelen llevar en cuenta la compleja organización típica de los sistemas vivos. Todos los sistemas biológicos suelen ser considerados, desde el punto de vista lógico, como una superposición de niveles de complejidad, desde el nivel microscópico de los átomos y moléculas, hasta el nivel macro de todo el organismo, a través de estructuras subcelulares, células, tejidos, órganos y sistemas. (...). Debido a la compleja estructura de los sistemas biológicos, los campos eléctricos o magnéticos de teléfonos celulares suelen iniciar o promover efectos adversos para la salud de un organismo solamente a través de una serie de pasos en los diferentes niveles de complejidad biológica, desde el nivel molecular hasta los órganos y organismos".*

Estos niveles son los siguientes:

1. De pequeñas moléculas y iones inorgánicos a nivel atómico y físico-químicas
2. De las grandes moléculas orgánicas tales como proteínas y ácidos nucleicos
3. De la membrana de la célula, incluyendo los receptores, canales, compuertas y mecanismos de transporte iónico activo
4. De las funciones metabólicas y vías bioquímicas en el citoplasma y organelas
5. De los agregados de células, los tejidos, las redes de las células excitables, redes inmunológicas, etc.

Por otra parte, aun cuando se demostró la existencia de efectos a un nivel, esto no

significa automáticamente que ellos son importantes o influyen en los otros niveles de complejidad por encima de ellos. Según D'Inze, "*(aunque) la funcionalidad de cada nivel está relacionada con todos los niveles inferiores, no está completamente determinada por ellos, es decir, cada nivel muestra las así llamadas propiedades emergentes.*"

Desde una abordaje didáctica, los efectos biológicos posibles de los campos de RF a nivel molecular se han clasificado en dos tipos principales:

1) **los efectos térmicos**, debido al fenómeno de calentamiento dieléctrico que es típico de las radiaciones no ionizantes (RNI), tales como microondas. La energía de la RNI no es suficientemente alta como para interaccionar con los orbitales exteriores de los átomos y por lo tanto para romper los enlaces moleculares, de modo que el calor inducido por la agitación de las moléculas polares existen en el medio ambiente contribuye al aumento de la temperatura como objetivo plausible.

Se descubrió que el efecto térmico puede producirse incluso en niveles muy bajos de energía electromagnética, porque la mayoría de las células tiene un complejo mecanismo interno de respuesta al calor, incluyendo cascadas moleculares, proteínas de choque térmico, etc. Es sabido que la exposición a temperaturas muy altas durante un tiempo suficiente puede dar lugar a la desnaturalización de algunas moléculas, como las proteínas (lo que explica la cocción de los alimentos en hornos de microondas, que tienen niveles de energía RNI extremadamente altas). Sin embargo, para calentamientos muy débiles (que pueden ocurrir cuando las células están expuestas a RF de bajo nivel), sólo los efectos indirectos mencionados anteriormente son verosímiles y están suficientemente bien documentados.

2) **los efectos no térmicos** se han propuesto teóricamente como otros posibles mecanismos de interacción que no se deben a un aumento directo o indirecto de la temperatura local. Se han propuesto muchos modelos no térmicos, y se lo han estudiado experimentalmente en preparaciones *in vitro*. Varios autores han alegado que se han podido demostrar, pero esto sigue siendo un debate abierto en la comunidad científica, ya que muchos estudios no han podido demostrar que existen los efectos no térmicos. En muchos casos, se ha argumentado que estos efectos son causados por las reacciones normales de las células vivas a la calefacción. Como se muestra a continuación, todos los efectos no térmicos que fueron reportados como algo que ocurre en las células, tales como cambios en los niveles de enzimas, ninguno se muestra como no tener consecuencias para la salud del cuerpo, porque el les compensa fácilmente a través de su mecanismos homeostáticos normales.

Así, en relación con la exposición a RF de bajo nivel, el debate se centra en:

1. si los efectos no térmicos no existen en un determinado nivel de organización;
2. si son de magnitud suficiente y
3. si interaccionan con otros niveles de complejidad por encima de ellos, jugando un papel en la fisiopatología de organismos intactos.

Como veremos, la respuesta científica ha sido abrumadoramente negativa para los tres temas.

Recientemente, más de 100 artículos en 15 revistas diferentes mecanismos de acción celular y molecular han sido revisados por D'Inze (2009), que propuso una clasificación de

los supuestos efectos no térmicos en cuatro grupos de modelos:

1. mecanismos moleculares de resonancia;
2. acoplamiento a sistemas no lineales;
3. los efectos debidos a la acción directa de los campos eléctricos y magnéticos;
4. la cooperación debida a las interacciones entre los diversos componentes de la membrana celular y sus mecanismos de transporte.

Todos estos mecanismos se han documentado de forma experimental, a veces en niveles de baja densidad de potencia de exposición, pero los autores y los revisores no están de acuerdo en cuanto al mecanismo más plausible para la interacción de radiaciones no-ionizantes en el tema. D'Inze concluye que *"sin embargo, estos resultados no son extensibles a niveles más altos de complejidad biológica y, por lo tanto, no representan posibles efectos peligrosos para la salud humana"*.

Swicord y Balzano (2009) y la ICNIRP (2009), han examinado las pruebas actuales en la literatura de estudio de los mecanismos de interacción de la RF con la materia viva, tanto a nivel celular como en el cuerpo. El lector debe referirse a estos dos estudios amplios para una cobertura más detallada al respecto. A continuación resumimos algunos de los hallazgos más significativos.

Estudios sobre la oncogénesis en nivel molecular y celular Puesto que se consideran de suma importancia los efectos potenciales de la RNI en relación con la etiología del cáncer), la oncogénesis celular y subcelular ha recibido gran atención de la investigación internacional y, en consecuencia, una amplia literatura ha sido producido en este campo . Marino *et al.* (2009) revisaron la literatura sobre estos temas antes de 2000 y de 2000 a 2007. La revisión de los artículos publicados ha llevado a una propuesta de clasificación de acuerdo con una escala de cuatro puntos (incluyendo (1) pruebas suficientes, (2) evidencia limitada, (3) pruebas insuficientes, y (4), prueba de la falta de efecto), con el fin de describir el grado de incertidumbre de los efectos revisados. La escala fue adaptada de una desarrollada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (Repacholi y Cardis 1997).

La oncogénesis a nivel celular es sumamente compleja y aún en estudio. El cáncer es, de hecho, el nombre genérico de probablemente cientos de diferentes enfermedades con diferentes causas y diferentes historias naturales. Sin embargo, un común denominador es la inestabilidad genética causada por una cadena de cambios acumulativos en los mecanismos de reparación del ADN, la inactivación intracelular de los genes de inhibición de tumores o la expresión de oncogenes, la apoptosis de las células defectuosas, la reproducción, crecimiento y mecanismos para la supervivencia celular, etc.

Con el tiempo, estos cambios acumulados en la maquinaria genética de las células conducen a una línea celular que hereda los cambios y avances en ventaja reproductiva sobre las células normales, tornanse eternas (es decir, no mueren más), y contribuyen al crecimiento de tejido neoplásico (tumorigenesis).

Los estudios in vitro se pueden clasificar en algunas áreas de la investigación y experimentación: la genotoxicidad, la expresión de los oncogenes, la proliferación y diferenciación celular y la apoptosis.

**Genotoxicidad:** es el nombre dado a la propiedad de los agentes externos, como la

radiación electromagnética, de causar daño en el ADN directamente. El daño en el ADN se puede evaluar de manera experimental mediante la prueba del cometa, que identifica si se han producido daños y roturas de cadena sencilla en las moléculas de ADN dentro del núcleo (ensayo de cometa neutro) o de doble cadena se rompe (ensayo de cometa alcalino). El primero indica el daño reparable, mientras que el segundo de un daño que no se puede reparar, mucho más peligroso, porque lleva a cambios irreversibles en el material genético. Otra clase común de experimentos sirve para probar si la RF de bajo nivel es capaz de potenciar la genotoxicidad inducida por otro agente genotóxico conocido, o en líneas de células anormales (cancerosas). Otra manera de probar la genotoxicidad es investigar la aparición de micro-núcleos y de aneuploidía (número anormal de cromosomas), que están relacionadas con cambios en el ADN.

Varios experimentos de genotoxicidad de RF de bajo nivel que se publicaron antes de 2000 habían demostrado algún efecto (por lo general muy débil o difícil de interpretar debido a técnicas inadecuadas, controles insuficientes, etc.) . La mayoría de los experimentos, sin embargo, no ha mostrado efectos genotóxicos o estos no han sido reproducidos en relación a estudios previamente positivos (en algunos casos por los mismos autores, exactamente en las mismas condiciones (Marino, 2008a).

Un reciente revisión de estos autores, de 83 artículos en publicaciones que han investigado la genotoxicidad de la RNI hasta 2009, reveló que el 69% de ellos no mostraron ningún efecto, el 20% indicaron la presencia de efectos, y el restante 11% no fueron concluyentes. Una evaluación integral siguiendo la clasificación de las evidencias de acuerdo con la escala de la IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) que referimos arriba, concluyó que no había pruebas suficientes hasta ahora para interacciones de RF de bajo nivel con potencial genotóxico, así como la potenciación de otras mutaciones. Por lo tanto, como la oncogénesis depende estrictamente de su aparición en el nivel celular, no existe hoy un mecanismo plausible para explicar la etiología del cáncer en los niveles de RF por debajo de los niveles internacionales de seguridad.

Otro parámetro de carcinogénesis en las células es la transformación de células sanas en malignas. Esto puede ser investigada a través de efectos directos (llamados de iniciación) de la RF sobre el aumento de la transformación neoplásica causada por otros agentes conocidos (llamada de co-promoción o promoción). La mayoría de los experimentos publicados hasta ahora han sido incapaces de detectar transformación neoplásica provocada por las señales de microondas utilizadas en las comunicaciones móviles, con que lo que los revisores concluyen que existe una falta de evidencia para tales efectos.

### **Genes que causan cáncer y expresión de proteínas:**

La prueba más moderna y técnicamente superior para evaluar cuantitativamente la carcinogenicidad potencial debido a la exposición a RF de bajo nivel es el uso de técnicas de alto rendimiento de transferencia de datos para la investigación simultánea de las manifestaciones de miles de genes y la aparición de varias proteínas relacionadas a el cáncer (genómica y proteómica). Estas técnicas salieron poco después de 2000, cuando se desarrollaron aparatos para probar simultáneamente hasta 10.000 genes, utilizando las sondas de micro-matrices (micro-arrays). Entre los genes importantes para el cáncer figuran los pro-oncogenes que son parte de nuestro genoma, tales como c-fos, c-jun y c-myc, y las proteínas como p53, relacionada con la supresión del cáncer. Cuando se observa un aumento de la expresión un gen (*up-regulation*, o regulación hasta arriba, en

Inglés), su expresión se produce a un ritmo mayor de lo normal (es decir, sintetiza más de la proteína normal relacionado con él), Si la expresión se ve disminuida (*down-regulated*, o regulación hasta abajo), es lo contrario. Efectos biologicamente perjudiciales se pueden obtener en ambas expresiones, tanto las que disminuyen como las que aumentan, pero los resultados son normalmente difíciles de interpretar.

Los resultados observados hasta ahora han sido muy heterogéneos: algunos experimentos con las pruebas de expresión genética a gran escala encontraron una ausencia total de efectos de exposición a la RF de bajo nivel, mientras que otros han encontrado incremento en la expresión . Por ejemplo, Zhao R. *et al.* (2007) investigaron los efectos sobre la expresión genética de la exposición intermitente de una cultura de neuronas de rata a la RF con una SAR de 2 W / kg. Entre 1200 genes candidatos se encontraron 24 genes con una expresión elevada y 10 con disminución en la expresión. Varios otros estudios han identificado genes con expresión aumentada. Estos eran en su mayoría relacionados con la síntesis de un grupo de proteínas denominadas caspasas, que participan en la apoptosis (un tipo de muerte celular en células con defectos), mientras que el descenso en la expresión de los genes estaba relacionado a las propiedades de regulación de ciclos de vida celulares.

Se carece de datos de validación en la mayoría de estos estudios positivos, por lo tanto, su significado es difícil de interpretar. En contraste con estos estudios, otros no han proporcionado evidencia de cambios significativos en la expresión génica mediante la tecnología de microarrays. Por ejemplo, Gurisik *et al* (2006) encontraron cambios en sólo 6 de los 8400 genes analizados, sin embargo, estos fueron débilmente inhibidos. En otros trabajos, se halló muchas veces un gran número de genes o proteínas alteradas, pero sin un patrón consistente, en general, lo que nos permite concluir que se trata de efectos no específicos, muy probablemente debido a cambios bruscos de temperatura, aunque los experimentadores a menudo han argumentado que un efectuado un riguroso control de las variaciones de temperatura. Cambios de síntesis en el grupo de proteínas conocidas como hsp (en inglés, proteínas de choque térmico) en muchos de estos estudios proporcionan evidencia de que esto realmente podría ser el caso, sobre todo porque se alteran no cuando se hace incidir irradiación de RF, pero cuando la temperatura media de la cultura es aumentada.

Por otra parte, la significación patológica de la expresión génica amplia es desconocida y difícil de interpretar. En general, la revisión crítica de estos estudios han concluido que la evidencia es limitada o hay una falta de pruebas consistentes de la causalidad de los genes relacionados con el cáncer y la expresión de proteínas, bajo una exposición a la RF de bajo nivel de intensidad.

### **Proliferación y diferenciación celular:**

Se trata de dos características importantes de las líneas de células neoplásicas: un aumento en la proliferación celular, lo que lleva al crecimiento del tumor, y una disminución en la diferenciación (des-diferenciación) de las células cancerosas, aumentando su resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. Conjuntamente, aumentan el potencial de diseminación metastásica y el grado de malignidad del tumor. Las líneas celulares más comunes investigadas proceden de tejidos humanos normales y de fibroblastos normales de rata (células del tejido conectivo), y algunas linajes de células cancerosas, tales como linfoblastos y células tomadas de neuroblastomas. Una vez más, lo que se observa es que hay una gran variabilidad de resultados entre diferentes estudios

que son difíciles de interpretar, ya que los métodos y las condiciones utilizadas por ellos no pueden ser adecuadamente identificados y comparados, incluidos el control muy importante de exposición a la RF, midiendo con precisión el nivel de densidad de potencia, y el control de variación de control de temperatura. Los revisores (Marino *et al.*, 2009) concluyen que "no hay pruebas suficientes en general de existencia de efectos positivos de la RF de bajo nivel en estos parámetros."

### **Apoptosis:**

La muerte celular programada, es decir, una cadena muy específica y compleja de eventos celulares que inducen defectos intrínsecos y extrínsecos en las células y conducen a una especie de "suicidio" celular. El contenido de la ruptura de la célula es digeridas por células inmunes como los macrófagos. Una familia de enzimas (las caspasas) está implicada en este proceso, por lo tanto ellas pueden ser evaluadas en estudios experimentales, proporcionando evidencia indirecta del nivel de apoptosis en los preparados *in vitro*. Hay muchos estudios que investigaron la apoptosis en las células normales y cancerosas (malignas) en varias cepas derivadas de tumores derivados de la exposición a la RF de alta y baja potencia. A la inducción potencial de la apoptosis en las células normales se considera peligroso, pero se considera beneficiosa cuando se produce en un nivel más alto en las células tumorales (que podría ser la explicación, por ejemplo, de la eficacia de algunos tipos de radiación ionizante instrumentados, como los rayos X y gamma en el crecimiento de un tumor en la oncoterapia, ya que uno de los principales defectos en el cáncer es la producción de células que son incapaces de lograr apoptosis, es decir, la formación de una línea celular "eterna"). Una vez más, el resultado global de la evaluación de trabajos publicados en esta línea de investigación es que no hay pruebas de que la exposición a RF de baja frecuencia puede inducir apoptosis en células normales, y que la RF actúe como agente pro-apoptótico externo sobre células tumorales; y una evidencia inadecuada que la exposición a RF de bajo nivel puede interactuar con agentes pro-apoptóticos conocidos en preparaciones *in vitro*.

### **Conclusiones de los estudios *in vitro***

La evidencia científica actual sobre los mecanismos moleculares y celulares probables de la RF ha sido revisada y evaluada críticamente por varios grupos e instituciones nacionales e internacionales. Hasta ahora, los últimos hallazgos parecen ser unánimes.

Por ejemplo:

**Suecia SSI (2008)** *Investigaciones recientes sobre campos electromagnéticos y riesgos para la salud - Quinto Informe Anual de la SSI: Grupo Especializado en Campos Electromagnéticos, 2007 (edición revisada del 15 de abril de 2008)*  
<http://www.stralsakerhetsmyndigheten.se/Global/Publikationer/Rapport/Stralskydd/2008/ssi-rapp-2008-12.pdf>

*La mayoría de estos estudios no mostraron efectos de la exposición a RF de los resultados estudiados, incluyendo también los intentos de reproducir los efectos genotóxicos observado en el reflejo europeo ". (...) Seis estudios recientes sobre la carcinogenicidad, algunos con tasas de exposición mayor que las utilizadas anteriormente, siempre retrata a la falta de cancinogénico efecto y dos estudios de genotoxicidad retratar el micro-núcleo o la ruptura de la cadena de ADN no aumenta después de la exposición a la RF."*

**ICNIRP (2009): "Exposición a campos electromagnéticos de alta frecuencia, los efectos biológicos y de salud (100 kHz - 300 GHz)"**

<http://www.icnirp.de/documents/RFReview.pdf>

*El mecanismo por el cual la exposición a energías de radiofrecuencia calienta el tejido biológico se entiende bien, y el efecto más notable y constante de la exposición a RF es la elevación de la temperatura, que puede causar una serie de cambios fisiológicos y patológicos en los seres humanos y animales de laboratorio. Aumento de la temperatura también es responsable de la posible confusión en los estudios in vitro y puede dar cuenta de algunos efectos positivos reportados.*

## **La investigación en América Latina**

Son muy pocos los estudios *in vitro* de los efectos biológicos de la RF que se han realizado en América Latina. Los trabajos de Heinrich y sus colegas (2006, comunicación preliminar de la base de datos de la OMS) en la Universidad Estatal de Campinas, Brasil, estudiaron los efectos de la radiación de microondas que emiten los teléfonos móviles en los cromosomas de los linfocitos humanos *in vitro*. La técnica del cariotipo espectral se utilizó para este fin. Los investigadores concluyeron que no se pudo observar daños a los cromosomas en los niveles de radiación consistente con los estándares de la ICNIRP, o por debajo de ellos, al menos para los dispositivos que funcionan a 800 MHz por las normas AMPS y CDMA. En niveles superiores a 10 W / kg se observó un cierto daño cromosómico, lo que indica un efecto dependiente de la dosis en el aumento de los cromosomas acrocéntricos y en los cambios en su longitud.

## **Conclusiones**

Como veredicto final de la evaluación crítica de la bibliografía acerca de las funciones celulares relacionados con la oncogénesis tras la exposición a RF de baja intensidad por lo general concluye que la evidencia presentada por estos estudios hasta la fecha de una relación causa-efecto son insuficientes, o que hay una falta de coherencia en pruebas válidas. Existe una gran confusión y controversia en este campo de investigación, porque a menudo la investigación que tuvo efectos positivos no se ha podido validar o reproducir por otros investigadores. En particular, los efectos de corta duración sobre el ciclo celular y su regulación, expresión génica y la síntesis de proteínas, el daño al material genético (ADN) y la transformación en relación con la diferenciación celular y oncogénesis celular, no se puede traducir automáticamente como causal para el cáncer. Por ejemplo, la mayoría de los cultivos celulares utilizados en estos experimentos, como las células del sistema hematopoyético, son altamente susceptibles a muchos de los agentes físicos externos. Incluso pequeños cambios de temperatura los afectan, pero es probable que ocurra cuando se irradian externamente al cuerpo, ya que elimina la protección natural dada por los mecanismos homeostáticos. Por lo tanto, la relevancia de estos resultados para la salud humana puede ser cuestionada.

En la siguiente sección discutiremos sobre los estudios relacionados con el cáncer en el cuerpo intacto (*in vivo*).