

TESIS DOCTORAL



EFFECTOS DE LA MAGNETOTERAPIA EN
LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE CÁNCER
DE MAMA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Radiología y Medicina Física
Programa de Doctorado en Ciencias Radiológicas y Medicina Física

M^a Del Mar Salinas Asensio

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: M^a del Mar Salinas Asensio
D.L.: GR 2328-2014
ISBN: 978-84-9083-374-2

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Naturaleza de la radiación electromagnética.....	1
2.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CEM	9
2.1.- Efectos sobre la membrana celular.....	18
2.2.- Efectos sobre el citoesqueleto de la célula.....	20
2.3.- Efectos sobre el Citoplasma.....	21
2.3.1.- La interrupción del primer y segundo mensajeros.....	22
2.3.2.- Alteraciones en la vía MAPK.....	24
2.4.- Efectos Nucleares.....	27
2.4.1.- Expresión Génica.....	27
2.4.2. Daño del ADN.....	28
2.4.2.A.- El estrés oxidativo.....	29
2.4.2.B.- Roturas dobles de cadena, aberraciones cromosómicas e inducción de micronúcleos.....	32
2.5.- Modulación de la tasa de proliferación y la progresión del ciclo celular.....	35
2.6. Apoptosis.....	43
3.- CMs COMO TRATAMIENTO COADYUVANTE DE LA RT	46
3.1.- Carcinogénesis.....	47
3.1.1 Genes implicados en el desarrollo del cáncer.....	48
3.2.- Efecto genotóxico de la radiación ionizante (RI).....	51
3.2.1.- Interacción de la radiación con los sistemas biológicos.....	51

3.2.2.- Radiación ionizante: daño en el ADN.....	54
3.2.2.A.- Respuesta al daño del ADN.....	58
3.2.2.B.- Moléculas sensoras del daño.....	58
3.2.2.C.- Moléculas efectoras del daño.....	59
3.2.2.D.- Muerte celular programada: apoptosis.....	60
3.2.2.E.- Puntos de control del ciclo celular y radiosensibilidad.....	60
3.2.2.F.-Reparación del daño producido por radiación.....	62
4. EFECTOS IN VITRO DE LOS CEM Y LA RI.....	63
5.- EFECTOS IN VIVO DE LOS CEM Y RI.....	67
6.- CEM Y CÁNCER DE MAMA (MCF-7 y MDA-MB-231).....	68
7.-HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	73
8.-OBJETIVOS.....	74
I. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1.1.- Instrumentación.....	75
1.1.1.- Magnetomed 7100.....	75
1.1.2.- Citómetro de flujo.....	76
1.1.3.- Irradiador experimental.....	78
1.1.4.- Microscopio IX51.....	80
1.1.5.- Centrifuga MIKRO 22R.....	81
1.1.6.- Incubador Sanyo Co2 MCO-20AIC.....	81
1.1.7.- Cabina de flujo laminar. Telstar Bio-II-A/M.....	82
1.1.8.- Pipetas y pipeteros Eppendorf.....	84
1.1.9.- Frascos de cultivo.....	85
1.1.10.- Otros instrumentos utilizados.....	85

1.2.- Líneas Celulares.....	86
1.2. a. -MCF7 (ATCC® HTB-22™).....	86
1.2. b. - MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™).....	86
2.- Métodos.....	87
2.1.- Tratamiento de las células con CMs.....	87
2.2.- Tratamiento de las células con RI.....	88
2.3.- Protocolos.....	88
2.3.1.-Citometría de flujo para ciclo celular.....	88
2.3.2.- Medidas de estrés oxidativo.....	92
2.3.3.- Ensayos de supervivencia celular.....	95
I.- RESULTADOS.....	97
1.1.- Medidas de citometría de flujo.....	97
1.1.1.-Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día). Línea celular MCF-7.....	97
1.1.2.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/4 días). Línea celular MCF-7.....	119
1.1.3.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día). Línea celular MDA-MB-231.....	123
1.1.4.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/4 días). Línea celular MDA-MB-231.....	143
1.1.5.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día) y/o radiación ionizante. Línea celular MCF-7.....	147

1.1.6.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMS (30 minutos/1 día) y/o radiación ionizante.	
Línea celular MDA-MB-231.....	154
1.2.- Medidas de Estrés Oxidativo tras la aplicación de CMs y RI.....	161
1.3.- Medidas de la capacidad clonogénica de las células tras la aplicación de CMs y RI.....	167
9.- DISCUSION	171
9.1.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día).....	176
9.2.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/4 días).....	180
9.3.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de RI.....	181
9.4.-Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día) y radiación ionizante.....	183
9.5.- Medidas Estrés oxidativo tras la aplicación de RI y el tratamiento combinado con CMs y RI.....	185
9.6.- Medidas de la capacidad clonogénica de las células tras la aplicación de CMs y RI.....	187
CONCLUSIONES	193
ABREVIATURAS	197
Referencias Bibliográficas	201

INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

1.- Naturaleza de la radiación electromagnética

El término radiación hace referencia a la propagación de energía de un lugar a otro por medio de ondas o partículas. La radiación electromagnética (REM) se refiere, por tanto, al transporte de energía mediante campos eléctricos (E) y magnéticos (H) que se desplazan simultáneamente, perpendiculares entre sí y a la dirección de propagación de la onda. Las radiaciones electromagnéticas se diferencian entre sí por la energía que tienen asociada, utilizándose el término de espectro electromagnético para describir el rango de todas las posibles frecuencias de la radiación electromagnética (**figura 1**). Dependiendo de la energía, la REM se clasifica en radiación ionizante, cuando ésta es lo suficientemente elevada como para separar los electrones de sus órbitas alrededor de los átomos e ionizar a aquellos, propiedad que se atribuye por ejemplo a los *rayos X* y *rayos γ* [IARC 2002]. La exposición a largo plazo a radiación ionizante provoca efectos nocivos para la salud.

Sin embargo, cuando su energía no es lo suficientemente fuerte como para ionizar moléculas, se denominan REM o campos electromagnéticos (CEM) no ionizantes y se consideran, al menos conceptualmente, como no perjudiciales para la salud.

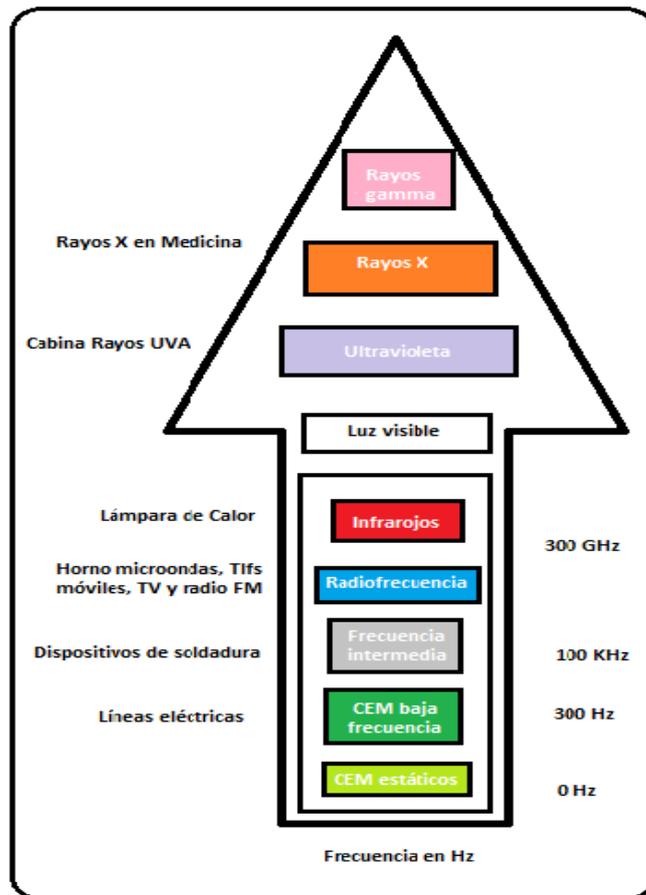


Figura 1: Espectro REM. Tomada y modificada de revistas de [hpt://www.ciencia.com](http://www.ciencia.com)

El espectro de la REM incluye, de menor a mayor energía (a partir de 300 GHz), radiofrecuencias, microondas, infrarrojo, luz visible y la mayor parte, el ultravioleta. Los CEM se sitúan por debajo de los 300 Hz, tal y como se puede ver en la **figura 1**.

Las variaciones de los campos eléctricos y magnéticos dependen de la fuente emisora de estas ondas, la mayoría de fuentes electromagnéticas construidas por el hombre producen ondas con intensidades de campo que varían de forma sinusoidal con el tiempo.

La frecuencia asociada a una onda es un parámetro que se define como el número de ciclos por segundo. Se denomina con la letra f y su unidad es el hertzio (Hz). La longitud de onda (λ) se define como la distancia mínima entre dos puntos que están en fase.

Las ondas se propagan en el vacío y en el aire a la velocidad de la luz (c); sin embargo, en los tejidos, esta velocidad es menor. La relación entre los parámetros anteriores viene dada por la ecuación $\lambda = c/f$. Así pues, los campos eléctricos y magnéticos se caracterizan por su magnitud, su dirección y las características de frecuencia de sus fuentes.

En general, en la literatura científica, la expresión, CEM, se emplea sólo con respecto a los campos electromagnéticos no ionizantes situados por debajo de la luz visible en el espectro, y por lo tanto, nos centraremos en éstos y utilizaremos este término (CEMs) para evitar posibles confusiones. Los CEMs se clasifican

tradicionalmente de acuerdo con su frecuencia oscilatoria, de la siguiente manera: CEM de frecuencia extremadamente baja (ELF-CEM), de baja frecuencia (LF-CEM) y de frecuencia intermedia (IF-CEM), de 0 a 300 kHz, la radiofrecuencia (RF-CEM, 300 kHz-300 MHz), microondas y radar (MW-EMF, 300 MHz-300 GHz). Tratamiento de tumor con campo eléctrico (TTField) que es un término reciente, utilizado para describir la alternancia de los campos eléctricos de baja intensidad (1-3 V / cm), y la frecuencia intermedia (100-300 kHz) que son generados por electrodos aislados especiales aplicados a la superficie de la piel.

A altas frecuencias, los campos electromagnéticos se propagan por medio de campos eléctricos y magnéticos estrechamente acoplados (radiación ionizante). En el rango de radiofrecuencia, la capacidad de penetración en los tejidos es dependiente de la frecuencia. Para frecuencia extremadamente baja (ELF-CEM), los campos eléctricos y magnéticos se desacoplan, y pueden ser evaluados por separado, como si se produjeran a partir de fuentes independientes. En esta situación, el campo eléctrico apenas penetra en el cuerpo, y los efectos biológicos de los campos, se debe principalmente a la acción del campo magnético.

Las propiedades eléctricas que hacen referencia a la interacción de campos eléctricos y magnéticos respectivamente, con el cuerpo humano, son la *permitividad*: tendencia de un material a polarizarse ante la aplicación de un campo eléctrico y de esa forma

anular parcialmente el campo interno del material (ϵ) y la *permeabilidad*: capacidad de una sustancia o medio para atraer y hacer pasar a través de ella campos magnéticos (μ).

Los tejidos corporales son mejores o peores conductores de las corrientes, según las propiedades dieléctricas que presentan. Así pues, en aquellos que son conductores de electricidad por tener cargas eléctricas libres, las fuerzas de los campos eléctricos, pueden originar un flujo de corriente eléctrica. La conducción de corriente en un tejido humano, está también caracterizado por la *conductividad eléctrica*: la capacidad de un material que deja pasar la corriente eléctrica (σ). La densidad o cantidad de esta corriente (J) a través de la sección de un tejido, se relaciona con el campo eléctrico mediante la conductividad eléctrica según la ecuación:

$$J = \sigma E, \text{ siendo } E \text{ la intensidad de campo eléctrico.}$$

La permitividad determina las interacciones con el campo eléctrico y la constante dieléctrica define la capacidad para almacenar la energía del campo. La permitividad de los tejidos depende, en gran medida, del agua y del contenido en electrolitos, por lo tanto, tejidos con alto contenido en agua tales como la sangre, músculos, hígado y riñones tienen mayores constantes dieléctricas y conductividad que aquellos tejidos con menor contenido acuoso como la grasa y los pulmones. Si el organismo se comporta como dieléctrico, la respuesta ante el campo inducido en el tejido como consecuencia de la exposición a CEMs se determina considerando

únicamente su conductividad. En la **tabla 1** se recogen los valores de conductividad de diferentes tejidos corporales.

Tabla 1. Conductividades de diversos tejidos. Tomada de Gandhi [IARC 2002]

Tejido	Conductividad (σ)
Sangre	0,7
Hueso esponjoso	0,08
Músculo	0,06
Grasa	0,02
Piel	0,04

Las corrientes eléctricas originadas por el campo magnético son corrientes inducidas, por lo que, al actuar sobre el tejido de un organismo, sea más o menos conductor, la corriente pasará a través de las moléculas de agua, y éstas, al ser electrónicamente neutras y tener forma asimétrica (las cargas se sitúan opuestas), al aplicarles la corriente, las cargas de los dipolos giran de un lado a otro, trasladando la energía a las moléculas adyacentes (en corrientes de alta frecuencia, se irradia calor), o bien en las corrientes alternas, según la frecuencia aplicada, la corriente actúa sobre las moléculas

cambiando su polaridad (no se produce movimiento en la molécula, el calor irradiado es mínimo)[Toro 1996].

Un campo magnético (H) y su densidad de flujo magnético asociada (B) existen solo si hay cargas en movimiento, es decir, sólo si hay flujo de corriente eléctrica. La relación entre ambos parámetros viene dada por la ecuación:

$$B=\mu H, \text{ siendo } \mu \text{ la permeabilidad.}$$

Tanto el campo eléctrico, como el magnético, son magnitudes vectoriales caracterizadas por su módulo y su dirección. Así, los campos eléctricos quedan definidos como diferencia de potencial por unidad de distancia y sus unidades son voltio/metro (V/m). Los campos magnéticos frecuentemente se describen a través de su densidad de flujo magnético (B) como líneas magnéticas de fuerza por unidad de área, siendo la unidad el weber por metro cuadrado (wb/m^2), que en el sistema internacional se denomina Tesla (T). La unidad antigua es el gauss (G), siendo $1\text{G} = 10^{-4} \text{T}$.

La permeabilidad de los tejidos se caracteriza por la capacidad de concentración de las líneas de fuerza del campo magnético (CM), en función de ello los tejidos se clasifican en ferromagnéticos que son aquellos que presentan una minúscula cantidad de magnetita biogénica (Fe_3O_4), con permeabilidad igual o mayor a 1, por ejemplo el cerebro y otros tejidos. Otros tejidos son paramagnéticos y se caracterizan por una baja capacidad para concentrar las fuerzas y,

finalmente, los tejidos diamagnéticos son aquellos con una permeabilidad inferior a la del vacío ($\mu < 1$) [Toro 1993, IARC 2002].

Los campos eléctricos estáticos no penetran en el cuerpo. El campo es siempre perpendicular a la superficie corporal e induce una densidad de carga en ella. Una densidad de carga suficientemente alta puede ser percibida mediante su interacción con el pelo de nuestro cuerpo. Los campos magnéticos estáticos pueden interaccionar mediante tres mecanismos con los tejidos corporales:

- Interacción electrodinámica con corrientes iónicas tales como ocurre con el flujo sanguíneo o con la transmisión del impulso nervioso (solo se produce si la densidad de flujo es mayor o igual a 1 T).
- Efecto magneto-mecánico, se da como consecuencia de la orientación de determinados componentes corporales sometidos a la acción de campos magnéticos (pájaros y peces).
- Efecto Zeeman, actúa sobre la recombinación de radicales formados en diferentes procesos bioquímicos, hecho que puede influir en la concentración final de radicales libres muy reactivos presentes en los diferentes tejidos [IARC 2002].

Como se ha comentado en el párrafo anterior, existen corrientes eléctricas dentro del cuerpo (endógenas), que incluso producen campos magnéticos que se extienden fuera del mismo (bioelectromagnetismo). Como consecuencia, parece lógico pensar

que los organismos pueden verse influenciados por campos magnéticos y electromagnéticos externos (CEM exógenos, producidas por fuentes externas al cuerpo). La aplicación de estos CEM exógenos, pueden provocar cambios físicos al interactuar con los campos naturales del cuerpo. Los CEM exógenos, interaccionan con la materia viva, provocando diferentes consecuencias fisiológicas [Fedorowski et al., 1997]. La mayoría de las fuentes artificiales son de frecuencias extremadamente bajas, estos son entre otros, los transformadores, líneas de transmisión, equipos domésticos eléctricos, transmisores de radio, etc... Y pueden modularse si es necesario, por ejemplo, cuando se asocian con riesgos para la salud humana. Los campos electromagnéticos naturales son estáticos o varían muy lentamente. El campo eléctrico, en el aire, se transmite por encima de la superficie de la tierra a 100 V / m , pero durante fuertes tormentas eléctricas, se puede aumentar 10 veces o más. El campo magnético terrestre es de 50 mT (militeslas).

2.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CEM

Actualmente y debido al desarrollo tecnológico, nos encontramos expuestos a una amplia y gran variedad de CEMs. Para entender los efectos de los CEMs en los seres humanos, tienen que ser consideradas sus propiedades eléctricas, así como su tamaño y forma con respecto a la longitud de onda del campo externo. La principal dificultad para explicar el efecto de la radiación electromagnética en la salud humana reside en nuestra falta de

conocimiento sobre los mecanismos físico-químico internos, debido a la enorme complejidad intrínseca de los sistemas biológicos. Los primeros datos sobre exposición a CEM y riesgos para la salud corresponden a la década de 1960, cuando se realizaron estudios a trabajadores expuestos a CEMs así como a adultos y niños con residencia cercana a instalaciones eléctricas. Los resultados informaban sobre el posible efecto cancerígeno de los CEMs. En este sentido, Fröhlich fue un pionero, postulando que, los campos electromagnéticos pueden ejercer efectos a nivel biológico, provocando cambios eléctricos en la polaridad en las células vivas [Fröhlich 1968-1973, Toro 1996] y en las células de cáncer [Fröhlich 1978]. Desde entonces, se han descrito muchos casos de bioelectricidad en los seres humanos [IARC 2002].

Cossarizza, allá por el año 1988, también estudió el poder modulador de los CEM en la síntesis de ADN en linfocitos humanos, células fundamentales en la respuesta inmune, porque se pensaba que los CEM influían de forma negativa en la reparación de la síntesis de ADN en las mismas. Este estudio reveló que los CEM no interfieren en la capacidad de los linfocitos para reparar el daño del ADN ni en la supervivencia celular. [Cossarizza et al., 1989].

Durante los últimos años, ha habido una creciente preocupación pública sobre los posibles riesgos para la salud ante la exposición de radiación no ionizante. Existe controversia sobre si la exposición continuada a CEMs puede estar implicada o no en el

desarrollo del cáncer, así pues, existen diferentes artículos publicados que hablan de la relación entre CEM y enfermedad. En este sentido, se ha observado, por ejemplo, como la melatonina (hormona producida por la glándula pineal), disminuye sus niveles tras la exposición a CMs, hecho que se relaciona de forma indirecta con la aparición de cáncer, al potenciar la proliferación celular de células tumorales [Liburdy et al., 1993]. También Vizcaino describió que los niveles de melatonina decrecen tras la exposición a CM, lo cual puede ser un promotor indirecto de carcinogénesis [Vizcaino et al., 2003]. Otros autores ponen de manifiesto que la exposición a CMs estimulan los macrófagos, potenciando la generación de radicales libres con el consiguiente daño en el ADN [Simkó et al., 2004]. Por el contrario, Los primeros datos documentados sobre los efectos terapéuticos de los CMs, corresponden a 1973. Este tipo de corriente se usa para la cicatrización ósea, aprovechando que la generación de corrientes eléctricas con inducción magnética, aumentan la actividad de los osteoblastos (células formadoras de hueso). Por esta razón se emplean los CMs de una manera específica para tratar las fracturas de huesos.

También se utilizan para curar heridas en la piel y los tejidos subyacentes, ya que la aplicación de estas corrientes, a corto plazo, influye sobre los macrófagos, mejorando la respuesta inmune para aplicaciones terapéuticas [Simkó et al., 2004]. Los CMs disminuyen la inflamación y el dolor y se emplea como tratamiento postquirúrgico

[IARC 2002]. Los CMs también están indicados para el tratamiento de la depresión [Malmivuo et al., 1995].

Volviendo al planteamiento de que los CMs de baja frecuencia pueden interactuar con los sistemas biológicos, y ser perjudiciales para la salud, se sometieron, in vivo e in vitro, a roedores a éste tipo de agente físico (coincidiendo con la iniciación del proceso de tumores de piel, hígado y tumores mamarios iniciados por sustancias químicas), para observar el potencial genotóxico de los CMs [IARC 2002]. Por lo tanto el interés y la preocupación por los riesgos potenciales para la salud son comprensibles [Mccann et al., 1998].

Debido a la gran controversia sobre los efectos derivados a su exposición, este hecho nos ha llevado a revisar los artículos publicados sobre los efectos derivados de la exposición a CMs. Por esta razón se han seleccionado los artículos por la exposición a CMs; con diferentes frecuencias que van desde 0,16 Hz a 900 MHz. Aunque existe cierta controversia, la mayoría de los datos obtenidos de los estudios revisados en este trabajo sugieren que los efectos de la radiación ionizante en las células y tejidos se ven reforzados por los CMs, apoyando así su uso para mejorar el resultado de radioterapia (RT).

Debido a la enorme complejidad de los mecanismos moleculares, la respuesta celular tras la exposición a los CMs y la falta de consenso en cuanto a los programas de tratamiento, son fuente de controversia sobre los efectos biológicos de los CMs. Si nos

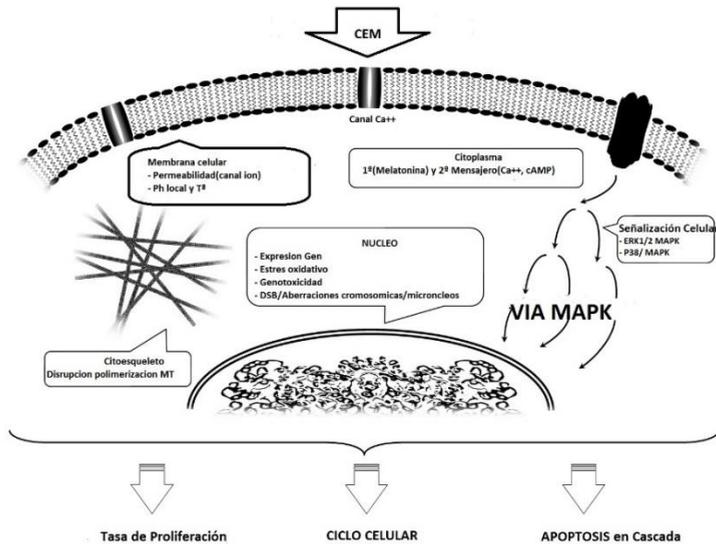
centramos en los estudios realizados en la aplicación de éstos en tumores, Sadeghipour, describe como al aplicar dos frecuencias diferentes (100 Hz y 217 Hz, o, 1 mT: 100G), entre 24-72 horas, se observa una gran disminución del crecimiento celular a las 72 horas (dosis dependiente). También se observó que tras la exposición de las células a CMs de frecuencia más elevada y durante un mayor tiempo, se produce un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), con respecto a cuando se aplican CMs de menor frecuencia [Sadeghipour et al., 2013]. Koh Ekryu estudia el empleo de los CMs de 60Hz, en células de cáncer de próstata in vitro, y describe como existe disminución del crecimiento celular, detección en el ciclo y la apoptosis inducida por ROS, tras la exposición de estas células a los CMs [Koh et al., 2008]. Estudios in vitro han puesto de manifiesto que la exposición a CMs con frecuencias menores de 100 Hz e intensidades bajas y con tiempo cortos, influye sobre una gran variedad de moléculas tales como el ADN y el ARN y sobre diferentes funciones celulares como la síntesis de proteínas y la proliferación celular, sobre el sistema inmunológico, y también afecta a distintos componentes de la membrana celular (hormonas, enzimas y neurotransmisores) [Cleary et al., 1993]. Se ha demostrado que la exposición a frecuencias extremadamente bajas de campo magnético y con intensidad de 400 mT: 4000G en células de ovario de hámster (CHO-K1), puede inducir mutaciones, mientras que a intensidades más bajas (menos de 1 mT: 100G), no está claro que se produzca este hecho. Por otro lado, se observó que una exposición prolongada a 50 mT: 500G, no aumenta la frecuencia de dichas mutaciones, pero si se

ha descrito un incremento de las mismas, causadas por la aplicación de Rayos X tras la exposición a CMs de baja frecuencia y 50 mT de intensidad, pudiendo sugerir que los CMs potencian las roturas de cadena de ADN causadas por la radiación ionizante aumentando el bloqueo celular en la fase S [Miyakoshi et al., 1999].

La exposición a los CMs también causa cambios de expresión génica y daño del ADN relacionada con la participación de la producción de radicales libres, que afectan a la estructura del ADN y provoca roturas de la cadena y otras aberraciones cromosómicas tales como la formación de micronúcleos. Todos estos cambios finalmente influyen en la progresión del ciclo celular, en la tasa de proliferación y en la muerte por apoptosis [Marnett et al., 2000, Simkó et al., 2007, Desai et al., 2009]

En los párrafos que siguen, se describen los distintos efectos observados en las células tras exposición a CEM, distinguiendo entre los diferentes tratamientos con CMs. La tabla 2 resume los resultados in vitro revisado en nuestro trabajo y la principal característica de un campo aplicado.

Figura 2. Principales efectos sobre la célula después de la exposición a los campos electromagnéticos (CEM). Tomada de Artacho-Cordón et al., 2013.



La figura 2 resume los principales efectos en la célula después de la exposición a los campos electromagnéticos (CEM). Estos alteran estructura de la membrana y la permeabilidad de pequeñas moléculas tales como Ca^{2+} causando cambios en el pH local y / o la temperatura. Los componentes del citoesqueleto se reorganizan después de la exposición a los CEM. En este sentido, se ha sugerido que la polimerización de microtúbulos puede ser interrumpida por una frecuencia intermedia externa (100-300 kHz). Los CEM provocan alteración en las vías de señalización celular (ERK1 / 2 MAPK y p38 MAPK) provocada por la desregulación de iones o por alteraciones en la melatonina y segundos mensajeros tales como Ca^{2+} y AMPc.

Tabla 2. Principales características de tratamientos y los resultados de los estudios in vitro aplicado. AC: Corriente alterna, CW: onda continua, DSB: dobles roturas de cadena; EF: corriente eléctrica; EMF: campos electromagnéticos; GSH: glutatión reducido; iNOS: inducible óxido nítrico sintetasa, MF: El campo magnético; MW: microondas; rms: raíz media cuadrática; S: densidad de potencia, SAR: tasa de absorción; ROS: especies reactivas del oxígeno; SOD: superóxido dismutasa.

Parte de la célula	Frecuencia	Intensidad	Tiempo	Tipo de CM	Efecto Biológico	REF.
Membrana celular	25 pulsos/s	Pico: 0.25 T Promedio: 0.5 T	238µs 1000 pulsos/día	AC MF	Cambios en el pH local y/o la temperatura	[59]
	< 100 Hz	< 100 µT	0-8 ns	MF	Formación de los canales iónicos	[60]
	MW (≈1GHz)	> 105 V/m	Varios periodos de oscilación	EF		[17]
Citoesqueleto celular	50 Hz	0.5-1.5 mT	45 min.	MF	Ninguna influencia de los CEM en las proteínas del citoesqueleto o motor	[160]
	50 Hz	2mT(RMS)	72h	MF	Cambios en la polimerización de microtúbulos	[153]
	100 – 300 kHz	V/cm 2	24h	CA EF		[80]
Citoplasma						
1/ 2 ⁿ mensajeros	60Hz	1.9-11,95 mG	--	MF	los CEM involucrados en la transmisión de Melatonina en la célula	[97]
	50 Hz	Pico: 3mT	24h	EMF	Influyen en el transporte de Ca ²⁺ y por lo tanto su homeostasis	[80]
	50 Hz	2 mT	5 min	MF	Desregulación de la concentración del campo	[143]

Parte de la célula	Frecuencia	Intensidad	Tiempo	Tipo de CM	Efecto Biológico	REF.
Vía MAPK	60Hz	0.8-300-MT	30 min	EMF	Inducción de la fosforilación de ERK1/2	[104]
	875 MHz	0.005, 0.03 y 0.11 mW/cm ²	30 min	EMF (S)		[160]
	900MHz	1 W/kg	24h	EMF (Sar)		[105]
	875 MHz	0.10 mW/cm ²	30 min	EMF (S)	Activación de p38 MAPK	[160]
	60Hz	6mT	30min/día 3 días	AC MF		[118]
Núcleo						
Expresión génica	60 Hz	0.8-300-MT	60 min.	MF	Aumento del factor de transcripción AP-1	[104]
	60Hz	8MT	20min campo-en; campo de 20min			[131]
	50 Hz	0,4 mT	20min	MF	Aumentar los niveles de proteína obligatoria del RNA	[45]
	900 MHz	1 W/kg	--	EMF (Sar)	Aumento en los niveles de mRNA de Egr-1 y survivin genes Bcl-2	[105]
Daños ADN						
1.1 sistema antioxidante	50Hz	1mT rms	24h	AC MF	Actividad ↓SOD	[40]
	50Hz	1mT	< 96h	MF	= Actividad SOD	[24]
	50Hz	1mT rms	24h	AC MF	Actividad ↓catalase	[40]
	50Hz	1mT	< 96h	MF	Glutación S-transferasa	[24]
	50Hz	1mT	< 96h	MF	Glutación peroxidasa	[24]
	50Hz	1mT	< 96h	MF	Cociente GSH ↑reducción/tot al	[24]

Parte de la célula	Frecuencia	Intensidad	Tiempo	Tipo de CM	Efecto Biológico	REF.
1.2 prooxidantes moléculas	50Hz	1mT rms	24h	MF	↑Inos	[40]
	930 MHz	5W/m ²	5-15 min.	CW EMF (S)	↑ROS	101
	900MHz	Pico de 2W 0.02mW / cm ²	30min/día; 7días	EMF (S)		[99]
	50Hz	1mT rms	24h	AC MF		[40]
	50Hz	1mT	< 96h	MF	= ROS	[24]
2. Genotoxicidad	60 Hz	6mT	30min/día; 1-3días	AC MF	Niveles elevados de γH2AX	118
	50 Hz	1mT	5 15 h, con campo / 10 campo-apagado	MF	Roturas de doble cadena	[70]
	50 Hz	1mT	24h	MF		166
	50 Hz	1mT	15h	EMF		[77]
	50 Hz	1 mT	15 h, 5' en campo / 10' sin campo	MF	Aberraciones cromosómicas	[70]
	50 Hz	1mT	2 – 24 h, 5' en campo / 10' sin campo.	MF	Inducción de micronúcleos	[70]

2.1.- Efectos sobre la membrana celular

Aunque todavía no existe un consenso acerca de si los campos electromagnéticos atraviesan la membrana celular, en general se cree que éstos tienen gran dificultad en pasar a través de ella [Funk

et al., 2009]. La posibilidad de penetración depende de la frecuencia de los CMs y del tamaño de la célula. Al actuar la corriente, se produce una relajación de la membrana por donde se abre una “brecha” o canal acuso, a través del cual se produce el intercambio de iones con otras células. Algunos estudios sugieren que la membrana celular podría ser una de las primeras localizaciones donde los CMs aplicados actúan sobre la célula. Las fuerzas de éstos podrían modificar las interacciones ligando-receptor, en la superficie exterior de la membrana celular, es decir, actúan en la unión de compuestos químicos mensajeros, tales como las hormonas y los factores de crecimiento, con moléculas especializadas en la membrana celular conocidas como receptores, las cuales a su vez podrían alterar el estado de grandes moléculas en la membrana celular que desempeñan un papel fundamental en el control de los procesos internos de la célula (CEM endógeno) [Schreier et al., 2006, Rubin et al., 2010, Rubik et al.,]. La permeabilidad de la membrana puede ser que aumente transitoriamente mediante la aplicación de un campo eléctrico, y este impulso podría ser transmitido químicamente. Este proceso ha sido descrito en varios trabajos, y se han postulado muchas teorías diferentes acerca de los fenómenos físicos subyacentes.

La estimulación eléctrica se sabe que causa cambios en el pH local y / o la temperatura [Funk et al., 2009], y esto podría conducir a la desestabilización de la membrana. Las proteínas ubicadas en la bicapa lipídica, funcionan también como canales de iones, lo que

contribuyen a la desestabilización de la membrana ya que la exposición a CM sin control conduce a la formación de canales iónicos en las células, induciendo de este modo modificaciones metabólicas graves [Galvanovskis et al., 1997, Funk et al., 2009]. Esto también se ha demostrado teóricamente en la exposición campos electromagnéticos en el rango de microondas (MW-CEM) [Cagni et al., 2007].

2.2.- Efectos sobre el citoesqueleto de la célula

El citoesqueleto de la célula, fisiológicamente, es el responsable de acontecimientos cruciales dentro de ésta, como el transporte intracelular y la división celular, siendo de especial importancia en ésta última función. En la literatura, hay una cierta controversia sobre la influencia de los campos electromagnéticos en la fisiología del citoesqueleto. Existen numerosos estudios in vitro en los que se pone de manifiesto que los CEM de baja frecuencia alteran la proliferación celular, provocando modificaciones en la expresión de proteínas relevantes en el ciclo celular (ciclinas, CDKs, p21, p16), incremento en la progresión del ciclo celular y acúmulo de células en la fase G1 [Simkó et al., 2004]. Aunque algunos investigadores han informado de que no hay influencia de los campos electromagnéticos en el citoesqueleto y / o proteínas motoras en los macrófagos murinos [Simkó et al., 2001], otros estudios han demostrado que los componentes del citoesqueleto se reorganizan después de la exposición a los CEM [Santoro et al., 1997, Pokorny et al., 2012].

En las células que se están dividiendo se forma el huso mitótico que aparece organizado espacialmente y está constituido por microtúbulos que presentan momentos dipolares eléctricos elevados y, por tanto, pueden desorientarse en presencia de campos eléctricos. Los filamentos de actina también son polares, sin embargo, no se orientan espacialmente dentro de la célula y, por ello, no se ven afectados en gran medida por la exposición a estos campos. Kirson, demostró, por primera vez, que la exposición a campos eléctricos alternos de muy baja intensidad ($<2\text{V/cm}$) y de frecuencia intermedia (100-300 kHz) inhiben la división de células en cultivo debido a que alteran el proceso de polarización-despolarización de los microtúbulos y, por ello, influyen en la alineación y en la separación de los cromosomas. Este hallazgo implica que los CEM (campos eléctricos alternos) pueden afectar a la generación de aberraciones durante la división celular, lo que lleva a la inhibición de ésta y a una disminución de la tasa de proliferación [Kirson et al., 2004].

2.3.- Efectos sobre el Citoplasma

Las implicaciones biológicas de las interacciones de la membrana celular y los CEM se cree que afectan el citoplasma a través de diferentes vías de señalización celular. En la mayoría de los casos, la alteración de estas vías por la acción de los CEM, podría provocar la desregulación de los canales iónicos (como se explica en el **apartado 2.1**) o por alteraciones en las hormonas y los segundos

mensajeros, tales como Ca^{2+} o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), aunque otros mensajeros son también alterados por la exposición a los CEM [Pilla et al., 2011].

2.3.1.- La interrupción del primer y segundo mensajeros

La melatonina es una hormona lipófila secretada por la glándula pineal que puede cruzar directamente la membrana y unirse a diferentes receptores. En todos los casos, los receptores de membrana de melatonina están acoplados a las cascadas de segundo mensajero, que varían según las células, los tejidos y la especie [Luchetti et al., 2010]. Por lo tanto, muchas funciones celulares, incluyendo la proliferación celular, la apoptosis (muerte celular programada) y la progresión del ciclo celular, se ven afectados por los niveles de melatonina, ésta actúa directamente sobre el ciclo celular, alargando la fase G1 y retardando la entrada en la fase S, además de estimular la expresión de proteínas antitumorales (p53 y p21) [Cos et al 1996, Mediavilla et al., 1999,2010]. Aún no se ha establecido con exactitud, cómo afecta la exposición de los campos magnéticos (CMs) a la promoción del cáncer. Se ha propuesto que la interrupción de los niveles de melatonina tras la exposición a este tipo de corriente, es uno de los factores favorables a éste respecto [Löscher et al., 1994, Touitou et al., 2003,2006]. Datos recientes indican que la exposición continuada a CMs desestabiliza y deteriora las funciones de la melatonina dentro de la célula [Liburdy et al., 1993, Löscher et al., 1994], aunque este efecto parece variar de

acuerdo a las diferentes condiciones experimentales. De la misma manera se han realizado estudios in vitro en diferentes líneas celulares, MCF-7, que presenta receptor de estrógeno positivo y MDA-MB-231, con factor de estrógeno negativo, y se ha observado que la melatonina inhibe el crecimiento celular de las primeras, pero no lo hace en la segunda línea celular [Danford et al., 1983, Hill et al., 1992]. En la línea celular MCF-7, la melatonina, inhibe la proliferación celular, aumenta la expresión de p53, “regula el ciclo celular” y reduce la capacidad metastásica de estas células [Cos et al., 2003]. Por lo tanto, la relación entre los CM y el cáncer de mama, está estrechamente relacionado con los estrógenos, la producción de melatonina y diferentes hormonas. La melatonina es un antiestrogenico ya que disminuye la expresión de los genes de estrógeno [Girgert et al., 2010]. Los resultados del estudio de Chen, que concuerdan con los previos realizados por Girgert, describen que los CM pueden ser un factor de riesgo para padecer cáncer de mama, sobre todo en aquellas mujeres premenopausicas y con factor de estrógeno positivo [Chen et al., 2013].

La tirosina-kinasa, que es un iniciador del segundo mensajero y regula la proliferación celular también se ve influenciado por los CMs [Simkó et al., 2004].

Los niveles de Ca^{2+} pueden desempeñar un papel importante en la modulación de la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la citotoxicidad, así como contribuir a los mecanismos de

acción de los agentes contra el cáncer [Sergeev et al., 1998]. La exposición a este tipo de corriente altera el transporte de Ca^{2+} y su homeostasis [Aldinucci et al., 2000, Manikonda et al., 2007, Strauch 2009].

El AMPc, es un segundo mensajero utilizado para la transducción de señal intracelular conduce a una cascada de fosforilización que se puede activar por diferentes vías. Muchos investigadores han sugerido que una desregulación de las vías de AMPc y una activación aberrante de los genes controlados por AMPc, está vinculada a la inducción de la apoptosis y la inhibición del desarrollo de tumores en algunos tipos de cáncer [Dumaz et al., 2002, Rocha et al., 2008, Follin-Arbelet et al., 2011]. El tratamiento con CMs de baja frecuencia, en una variedad de ensayos in vitro y en modelos in vivo, ha demostrado que aumenta el AMPc, incluyendo células creciendo en monocapa y en esferoides, ratones y ratas, con lo que se ven mejoradas las funciones celulares vinculadas a este segundo mensajero [Schimmelpfeng et al., 1995, Hogan et al., 2004].

2.3.2.- Alteraciones en la vía MAPK

Para que la célula animal crezca y sobreviva no sólo necesita señales químicas derivadas de células vecinas, sino también del medio extracelular, compuesto por moléculas, que en su mayoría son proteínas solubles creadas por otras células o proteínas unidas a la superficie de otras células o a la matriz extracelular que actúan inhibiendo o estimulando el crecimiento celular. Las proteínas de

acción positiva que estimulan el crecimiento celular son las siguientes:

1. Mitógenos: estimulan la división celular, actúan para evitar mecanismos intercelulares que bloquen la progresión del ciclo celular. Estas proteínas, se unen a los receptores de la superficie celular, activando otras vías de señalización intracelular para estimular la división celular. Un ejemplo importante es la proteína del retinoblastoma [Rb], detiene la progresión del ciclo antes de entrar en mitosis, hasta que todo este correcto, por impide la proliferación celular. La inactivación de esta proteína, puede suponer el inicio de tumor.
2. Factores de crecimiento: estimulan el crecimiento, mediante la promoción de síntesis de proteínas y también por la inhibición de la degradación de proteínas y macromoléculas.
3. Factores de supervivencia, también estimulan el crecimiento, suprimiendo apoptosis [Alberts et al., 1999].

Nos centramos en la vía MAPK, ya que se considera la más importante implicada en la respuesta al daño del ADN después de la radiación ionizante y en la vía ERK1 / 2 MAPK, que es la que más se ve afectada por la exposición a CEM [Jin 2000]. Los MAPKs son una amplia familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos. Cuando estas proteínas fosforilan, la señal se transloca al núcleo, y la transcripción de genes se activa, para la división celular. Se ha

sugerido que la exposición CMs de extremadamente baja frecuencia puede afectar a varias vías de señalización celular, incluyendo la quinasa regulada extracelularmente (ERK), la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos 1/2 (MAPK) [Jin et al., 2000, Friedman et al., 2007, Buttiglione et al., 2007] y la vía p38 MAPK [Friedman et al., 2007, Kim et al., 2010]. Debido a que por lo general, éstas vías, están moduladas por factores de crecimiento, y por el AMPc y Ca^{2+} , como segundos mensajeros, se les ha relacionado con la proliferación celular, senescencia, diferenciación y apoptosis [Busca et al., 2000, Yamaguchi et al., 2004]. Jin, mostró que los CMs son capaces de inducir fosforilación de ERK1 / 2 [Jin et al., 2000]. De la misma manera, otros autores han encontrado resultados similares en las mismas líneas celulares sobre la activación de ERK1/2 [Nie et al., 2003, Friedman et al., 2007]. Además, el uso de CMs, incrementa la activación de SAPK / JNK y ERK1 / 2 MAPK en las células de neuroblastoma humano [Buttiglione et al., 2007]. En la misma línea celular se aplicaron CMs de forma intermitente (50Hz 100 μ T: 1G) y a las 42 horas se observó un incremento de células e la fase S por activación de la vía MAPK-ERK1/2. Friedman et al., sugirieron que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas tras la exposición a CMs, estimulan las metaloproteasas y liberan el EGF (factor de crecimiento epidérmico) que a su vez influye desencadenando la cascada de ERK 1/ 2 con la consecuente implicación en las diferentes funciones celulares [Friedman et al., 2007].

2.4.- Efectos Nucleares.

2.4.1.- Expresión Génica.

La expresión génica es un proceso meticulosamente regulado por AP-1, que es un factor de transcripción heterodimérico compuesto de proteínas pertenecientes a las familias c-Fos, c-Jun, ATF (factor de activación de la transcripción, “activating transcription factor”) y JDP (proteína de dimerización de Jun, “Jun Dimerization Protein”), regula la expresión génica, en respuesta a una variedad de estímulos, y controla un gran número de procesos celulares, incluyendo la diferenciación, la proliferación y la apoptosis [Jin et al., 2000]. Algunos autores describen como los CMs inducen un aumento de la activación de AP-1 a través de la proteína Hsp70, alterándose, por tanto las vía ERK1/2 Mapk y con ello las funciones celulares [Lin et al., 1998, Jin et al., 2000]. Frisch P, comprobó cómo al aplicar CEM de baja frecuencia (10 Hz y 20-500 V/M) durante 2 horas en células transfectadas de fibroblastos de ratas, se consiguió inducir la expresión de la proteína hsp70, aunque la respuesta de ésta proteína ante este tipo de corriente, es mayor en medios físicos con efecto térmico [Frisch 2013].

Las proteínas de unión de ARN son otra categoría de reguladores celulares de la expresión génica a nivel transcripcional. Estas proteínas constan de dos subunidades:

- *Subunidad de unión a ARN (RBS)*

- *Subunidad reguladora de unión al ARN (RS)*

Han, señaló que los CMs aumentan los niveles de RS, sugiriendo que éste, pueden participar en la respuesta celular a un tratamiento con CMs, en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 [Li et al., 2005].

Otro factor de transcripción, involucrado en la diferenciación celular es Egr-1, la activación de éste gen, tras la exposición a los RF-CEMs, da lugar a una disminución significativa en los niveles de ARNm de Bcl-2 (anti-apoptotica) y de los genes de survivina (inhibidor de apoptosis), con lo que aumenta la proliferación celular [Buttiglione et al., 2007].

2.4.2. Daño del ADN

Aunque en general se acepta que los campos electromagnéticos de frecuencia 50/60Hz podrían transferir energía insuficiente a las células como para dañar el DNA directamente, ciertos procesos celulares, tales como los radicales libres, pueden ser alterados por la exposición a los campos electromagnéticos; Cada vez más se está prestando atención a que los campos magnéticos estáticos y alternos afectan a procesos enzimáticos provocados por los radicales libres, esto se ha observado en la aplicación del campo con una intensidad de 0,1-1 mT: 1-10 G [IARC 2002], afectan indirectamente a la estructura del ADN y que provocan alteraciones en el material genético que conllevan a la inducción de roturas de la

cadena que si son reparadas incorrectamente dan lugar a la formación de micronúcleos: cuerpos citoplasmáticos en el que parte del cromosoma es acéntrico o todo el cromosoma no se va al polo opuesto durante la anafase.

2.4.2.A.- El estrés oxidativo

El estrés oxidativo, se origina por un desequilibrio entre las moléculas antioxidantes como por ejemplo, GSH, y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS). Se producen generalmente en la mitocondria. La hiperoxia y la disminución de antioxidantes llevan al daño tisular. Estos desequilibrios, son cruciales en la participación y en la promoción de la carcinogénesis [Marnett et al., 2000, Anastassopoulou et al., 2002], ya que provocan inestabilidad genómica [Colotta et al., 2009]. Los radicales libres pueden dañar y romper la molécula de ADN, producir mutaciones y provocar carcinogénesis a través de diferentes mecanismos, aumentando la malignidad y la aparición de metástasis [Ríos-Arrabal et al., 2013].

La formación de ROS no solo es propia del tumor sino también se da, por ejemplo, en los cambios fisiológicos que se desarrollan durante el proceso de envejecimiento. La generación de ROS influye también en distintos procesos biológicos importantes tales como la inflamación, la división celular, la diferenciación, la apoptosis, y senescencia celular. En consecuencia, los estudios in vitro que evalúan el papel de ROS en los efectos biológicos provocados por

CEM se han incluido como una línea de investigación de alta prioridad en la agenda de investigación de la OMS (2007).

Se ha sugerido que los CMs (50 Hz) producen radicales superóxido y que modulan la expresión y la actividad de enzimas relacionadas con el estado REDOX, influyendo en la generación de ROS. Esta producción excesiva de ROS, induce daño en el ADN, lo que conlleva al desarrollo de carcinogénesis. Todo lo anterior implica que los CEM de baja frecuencia pueden actuar como iniciadores del proceso de carcinogénesis en diferentes tipos celulares y distintas condiciones experimentales [Ríos-Arrabal et al., 2013]. Sin embargo, también se ha descrito que la exposición a CM estáticos (250 mT: 2500 G, 3 h) no produce estrés oxidativo ni daño en el ADN en la línea celular THP1 [Amara et al., 2007]. Otros autores han evaluado la formación de radicales libres tras la influencia a la exposición a CMs (60 Hz, 1 mT: 10 G) en células MCF10A, y no han encontrado modificación en los niveles de concentración de ROS, ni en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) [Hong et al., 2012]. Es importante destacar que las macromoléculas celulares, es decir, ADN, proteínas, y lípidos son muy susceptibles a los ataques de los radicales libres, pero en el organismo existe una gran variedad de sistemas de defensa, por lo tanto el estrés oxidativo que pudiera inducirse por exposición a CMs de baja frecuencia, puede verse contrarrestado gracias a la acción de sustancias antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) que protegen a la célula.

Se ha descrito que los CMs prolongan la vida media de los radicales libres que causan daño en el ADN y en otras macromoléculas celulares, así pues Lai describe que la exposición a CM con 60 Hz de frecuencia y 0,1-0,5 mT: 1-5 G de intensidad durante 24-48 h, incrementa la formación de radicales libres en las células de ADN del cerebro en las ratas, lo cual potencia la rotura de cadenas del ADN y la consiguiente muerte celular [Lai et al., 2004].

Otros autores han demostrado que la exposición de ratas, de forma crónica a CMs, provocan una disminución de las enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa (SOD) o glutatión peroxidasa (GSH-PX), y la reducción de potencial antioxidante celular [Desai et al., 2009]. Resultados similares se han encontrado en los linfocitos de rata tratados con iones de hierro [Zmyslony et al., 2004] y en el conejo [Irmak et al., 2002]. Además, un estudio reciente mostró que las ratas sanas que recibieron tratamiento con CMs de frecuencia extremadamente baja también presentaron un aumento de la producción de ROS, con mayores niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), después de exponerlos a CEM 40 Hz, 7 mT: 70 G, 60 min al día durante 14 días. La capacidad antioxidante en el plasma se redujo también. Sin embargo, cuando este programa de tratamiento se redujo a 30 min / día, no se detectó ninguna disminución significativa en el estado redox [Goraca et al., 2010].

Diferentes trabajos publicados han descrito cambios en el estado rédox en diferentes tipos celulares estudiados, incluyendo células de neuroblastoma [Falone et al., 2007], células de leucemia [Patruno et al., 2012] y fibroblastos [Lee et al., 2011, Jin et al., 2012]. En THP-1 células leucémicas agudas, los CEM reducen la actividad enzimática antioxidante, actuando sobre la vía de la iNOS [Patruno et al., 2012]. Según Friedman et al., cuando las células HeLa son tratados con exposiciones cortas a RF-CEM, hay un aumento en la actividad de la NADH oxidasa, una enzima de la membrana, lo que induce la producción de ROS. En consecuencia, se sintetizan metaloproteasas (MMPs), y éstas, a su vez, liberan el factor de crecimiento epidérmico y activan la vía de ERK [Friedman et al., 2007]. Dada la controversia encontrada en la literatura sobre si la exposición a CEMs genera radicales libres en las células, consideramos que este tema necesita ser más ampliamente estudiado.

2.4.2.B.-Roturas dobles de cadena, aberraciones cromosómicas e inducción de micronúcleos

La *genotoxicidad* (capacidad del agente químico, físico o biológico para causar daño en el material genético: ADN, cromosomas, huso mitótico, etc) viene dada por la magnitud de la corriente eléctrica y por la densidad, que varía dependiendo del tamaño de la célula y del medio donde se cultiva, de ahí que existan varias conclusiones contradictorias sobre la genotoxicidad. Por ejemplo, los CEMs orientados sobre el cultivo de forma vertical dan lugar a la

formación de micronúcleos en la línea celular tumoral SCL II. Por el contrario, en otro estudio con células amnióticas, no se encontraron efectos genotóxicos en aquellos lugares donde los CEM se generaban de forma horizontal, con lo cual también podemos decir que la orientación de los CEM aplicados influye en los efectos observados en las células [Simkó et al., 2004].

Una revisión de la literatura sugiere que sólo los campos electromagnéticos intermitentes pueden ejercer efectos genotóxicos celulares y que las células expuestas a los CMs continuos no sufren daño en el DNA [Winker et al., 2005, Falone et al., 2007, Hintzsche et al., 2012]. Ivancstis, estudió la exposición a los CEM, tanto continua como intermitente, y se observó efectos genotóxicos sólo cuando se utilizaron diferentes esquemas de exposición a los CEM intermitentes. Estos autores sugirieron, que someter las células a un campo constante puede inducir mecanismos de adaptación, protegiendo al genoma de las influencias nocivas. Mientras que los cambios regulares en las condiciones ambientales, podrían interferir con estos mecanismos y llevar a un deterioro del ADN en los fibroblastos humanos [Ivancsits et al., 2002]. Focke realizó el mismo estudio en diferentes modelos celulares humanos encontrando el mismo resultado [Focke et al., 2010]. Kim, ha informado del aumento de los niveles de fosforilización de H2AX (proteína que interviene en la detección y señalización del daño radioinducido) así como de la activación de p38 en células HeLa y fibroblastos de pulmón después de la exposición diaria a CMs, lo que implica incremento de lesión en

el ADN (roturas doble de cadena), y apoptosis [Kim et al., 2010]. Por otro lado, diversos estudios realizados con CMs, demostraron que aplicando el tratamiento de CEM (60 Hz 100 μ T: 1 G, 24 h o 7 días) en A₁ (células híbridas humanas y de hámster) no generaba efectos citotóxicos ni mutagenicos [Ansari et al., 2000].

Daños en el ADN, como roturas de doble cadena (RDC) conducen a la inestabilidad genómica. Simkó describe de la formación de micronucleos tras la exposición a CM 0,1-1 mT: 1-10 G por 24 h, 48 h, 72 h [Simkó et al 1998]. Otros autores, han encontrado que la exposición de fibroblastos humanos cultivados a CMs (50 Hz, 1 mT: 10 G, 15 h), conduce a inestabilidad genómica marcada por aumentos en las aberraciones cromosómicas [Winker et al., 2005]. Estos autores también informaron de la inducción de la formación de micronúcleos después de la exposición a CEM [Winker et al., 2005, Ruiz Gomez et al., 2009]. Su formación se ha asociado tradicionalmente con actividad genotóxica, y pruebas de micronúcleo son ampliamente utilizadas para evaluar los carcinógenos potenciales, ya que esta prueba ha sido descrita como un buen marcador biológico del daño originado en el ADN. Además, se ha documentado que la presencia de micronúcleos en las células podría conducir a la muerte por apoptosis de éstas [Winker et al., 2005].

2.5.- Modulación de la tasa de proliferación y la progresión del ciclo celular

Una respuesta apropiada a los factores endógenos (hormonas solubles, factores de crecimiento y genes), y también a los factores exógenos, tales como fármacos citotóxicos y al estrés ambiental, es necesaria para una correcta viabilidad celular [Hynes et al., 2003]. La proliferación celular es un proceso complejo controlado por múltiples vías de transducción de señales celulares. La duplicación del contenido de las células y la transferencia de esta información de una célula a otra, se realiza mediante el ciclo celular, y depende del tipo de célula. El ciclo celular se divide en 4 fases (figura 3):

1. FASE M (mitosis): en la que encontramos otras etapas de la célula.
2. FASE S (síntesis): replicación DNA
3. FASE G1 (GAP: intervalo) tiempo que media entre la fase M y la fase S
4. FASE G2: entre la fase S y fase M. En estas fases, la célula comprueba que esta todo correcto para comenzar la fase S y M. En los puntos G1 y G2 se determina si la célula pasa a la siguiente fase o se efectúa una pausa para completar la reparación en caso de daño. Si el ADN sufre daño, el ciclo debe interrumpirse en G1 (para permitir que la célula se asegure de que todo está correcto para la proliferación y que el ADN no está dañado para pasar a la fase S) O en

G2, que garantiza que las células si entran en la fase M es porque se ha reparado el ADN y entonces es posible completar su replicación [Alberts et al., 1999].

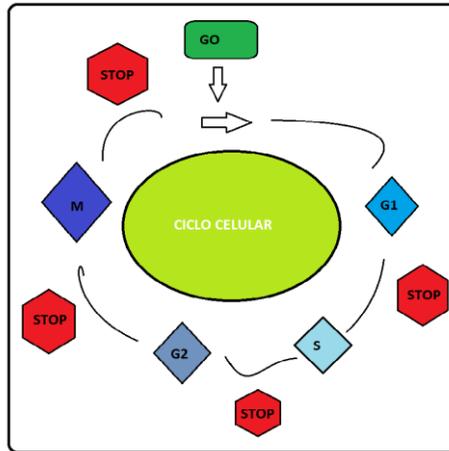


Figura 3: Ciclo Celular Normal. Tomada y modificada de [hpt//www.biocancer.com](http://www.biocancer.com)

La progresión de las células a través del ciclo celular se rige por la activación (fosforilización) e inactivación (desfosforilización) cíclicas de proteínas y complejos proteicos que inician o regulan la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis. La fosforilización se realiza mediante las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (Cdk), enzimas que transfieren un grupo de fosfato de una molécula de ATP a una cadena lateral de aminoácidos de la proteína diana. Estas proteínas se expresan durante todo el ciclo celular y se activan y desactivan según se encuentren en una fase u otra del mismo [Alberts et al., 1999]. La activación de las proteínas quinasas

depende, principalmente, de las ciclinas de manera que no ejercen actividad enzimática por sí mismas y deben unirse a las ciclinas para adquirir la actividad enzimática, así pues se les conoce como *proteínquinasas dependientes de ciclinas* [Alberts et al., 1999]. Para que se lleve a cabo la progresión a través del ciclo celular, diferentes Cdk se asocian a distintas ciclinas formando complejos ciclina-Cdk. Así, por ejemplo, el complejo ciclina B/Cdk1 juega un papel crítico en la transferencia de la fase G2 a M [Simko et al., 2004]. La eliminación de la ciclina degrada el complejo ciclina /Cdk quedando inactivada la Cdk concluyendo así la fase de mitosis.

El sistema de control del ciclo celular debe garantizar que la replicación del DNA comience en el momento apropiado y no se produzca más de una replicación por ciclo. No se conocen con exactitud los mecanismos moleculares cuya función es la de interrumpir la progresión del ciclo celular en los distintos puntos de control. Sin embargo, se sabe que en este proceso intervienen también proteínas que específicamente inhiben a las Cdk y bloquean la actividad de uno o más complejos de ciclina-Cdk. Los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas se agrupan en dos familias.

La primera de ellas denominada CIP/WAF, está formada por las proteínas p21, p27 y p57. La segunda denominada INK4 agrupa a las proteínas p15, p16, p18 y p19. Cuando se detectan lesiones en el DNA, una de las proteínas que aumenta su concentración de la es p53, la cual activa la transcripción de p21 que se une los complejos

ciclina D/Cdk4-6 e impide que se promueva la progresión de la célula desde la fase G1 a la S. Esta parada del ciclo permite ganar tiempo para que la célula pueda reparar el DNA dañado antes de su replicación. Si la proteína *p53* está ausente o es inactiva, la replicación del material genético se produce con lesiones no reparadas y da lugar a daño acumulado en la célula favoreciendo que su progenie tienda a malignizarse. De hecho, el gen *p53* aparece alterado en una gran cantidad de tumores humanos [Alberts et al., 1999].

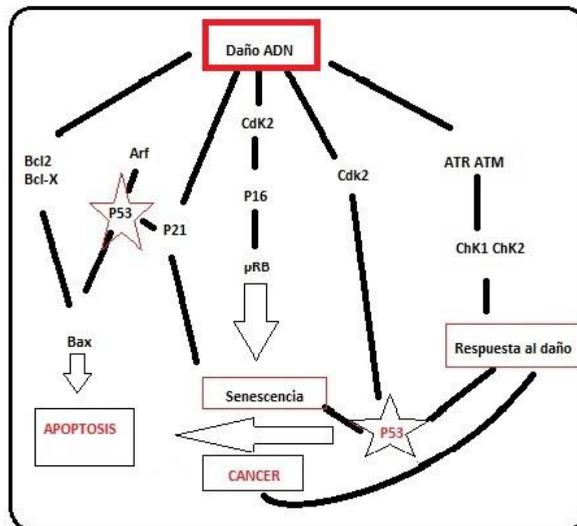


Figura 4: Secuencia celular tras ADN dañado. Tomada y modificada de Larsson LG¹, Henriksson MA.

Estudios recientes, han sugerido que la exposición a ELF-CEM, repetitivos, con 6 mT: 60 G, disminuye la viabilidad celular mediante la inducción de roturas de doble cadena de ADN [Kim et al., 2010]. Ha sido descrito que los CEM afectan a la progresión de las células a lo largo del ciclo [Simkó et al., 2004]. Los estudios realizados ponen de manifiesto alteraciones en la fase G1 tras la exposición a 50 Hz de CEM, ya que parece que actúan sobre las proteínas reguladoras del ciclo celular: ciclina D1, Cdk4, p16^{INK4a} y p21^{Cip1}, que son fundamentales para la progresión a través la fase G1 y la transición G1 / S y juegan un papel crítico en el desarrollo del cáncer. Otros estudios sugieren que los CEM no provocan cambio en los niveles de cdk4, ni alteración en la síntesis de ciclina D, en las células MCF-7 expuestas a 60 Hz y 9 G durante 6 h, 9 h y 12 h. Numerosos estudios mostraron que, después de la exposición de células a CEM, se detectan cantidades crecientes de p16^{INK4a} que pueden bloquear con eficacia la formación del complejo ciclina D1/CDK4, hecho que a su vez conduce a una inhibición de la actividad de la quinasa 4 (cdk4) fomentando que las células se acumulen G1 y les impide entrar en la fase S. En el mismo estudio, se detectó un mayor nivel de p21^{Cip1} después de la exposición a campos electromagnéticos, lo que es lógico, puesto que p21^{Cip1} es capaz de inhibir la actividad de quinasa cdk4 y por lo tanto, influir también en la transición G1/S. Sin embargo, p21^{Cip1} es un inhibidor de varias ciclinas y Cdk. Por lo tanto, el retraso observado en la fase G1 también puede ser una consecuencia de la interacción de p21^{Cip1} con la ciclina E del complejo

ciclina E/CDK2, que juegan un importante papel en la regulación de la transición desde finales de G1 a la fase S [Simkó et al., 2004].

Durante la fase de síntesis, las células replican su ADN para permitir la división de las células en dos células hijas, cada uno con una copia completa del genoma. Dado que la exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia podría causar cambios en la síntesis de ADN, varios estudios han demostrado el efecto proliferativo de los CEM. Muchos estudios han informado de que la exposición a CEM (50Hz 20 μ T: 0,2 G y 200 μ T: 2 G) dá lugar a un retraso en el inicio de la síntesis de ADN en fibroblastos humanos, lo que indica una mayor duración de la fase G1 [Simkó et al., 2004]. También hay resultados que sugieren que a 60 Hz y con intensidades de 0,9 y 1, 2 G, respectivamente, pueden aumentar la timidina en el ADN de células de astrocitoma en una manera, mientras que la exposición a CEM de 0,6 G no tuvo ningún efecto sobre la síntesis de ADN. A nivel de G2/M no se observa ningún cambio provocado por los CEM (inhibición de reparación del ADN) [Simkó et al., 2004].

Se han publicado datos que difieren acerca de la exposición a CEM y el aumento [Wolf et al., 2005, Ruiz-Gomez et al., 2010], inhibición [Tofani et al., 2001, Tatarov et al., 2011] o la ausencia de efecto sobre la tasa de proliferación celular [Yoshizawa et al., 2002, Ruiz-Gomez et al., 2004]. Pasche, desarrolló un nuevo enfoque para el tratamiento de carcinoma hepatocelular avanzado (HCC), que consistió en la administración intrabucal de niveles muy bajos de RF-

EMF, con modulación de amplitud en frecuencias específicas en pacientes con cáncer [Alexandre et al., 2009].

El estudio de fase I / II realizado puso de manifiesto que el tratamiento con campos electromagnéticos de amplitud modulada intrabucal administrados es seguro, bien tolerado y muestra antitumorales en los pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado [Costa et al., 2011]. En un reciente estudio in vitro, los mismos autores demostraron una disminución de las tasas de proliferación celular en líneas celulares de carcinoma hepatocelular y de cáncer de mama después de la exposición a los CEM [Zimmerman et al., 2011]. Este mismo efecto ha sido observado por otros autores utilizando fibroblastos [Focke et al., 2010], células de glioma y de melanoma [Kirson et al., 2007]. Estos resultados sugieren que las frecuencias óptimas pueden variar entre los tipos celulares de cáncer, estando inversamente relacionadas con el tamaño celular [Kirson et al., 2004,2007].

Kirson, llevó a cabo experimentos in vivo y se encontró que el crecimiento tumoral se redujo después de la exposición a campos eléctricos alternos en modelos de ratón para carcinomas de mama y de pulmón de células no pequeñas [Kirson et al., 2004].

Se han realizado pocos estudios para evaluar el papel de los campos electromagnéticos en la progresión del ciclo celular. Algunos trabajos han sugerido que hay retrasos del ciclo celular en diferentes pasos. Kim, ha informado de aumento de los niveles fosforilación

de la proteína Chk2 después de aplicar 60 Hz ELF-MFS en HeLa y fibroblastos de pulmón [Kim et al., 2010]. Esta proteína participa en un punto de control del ciclo celular típico inducido después del daño originado por radiación ionizante a través de la vía de ATM / ATR.

Dado que los CEM podrían alterar tanto la polimerización de microtúbulos y la proteína Retinoblastoma (Rb), por lo tanto, provocan perturbaciones de replicación y parece razonable sugerir que la exposición a campos electromagnéticos puede acumular más células en la fase S que en las otras fases del ciclo celular.

La exposición a CEM provoca un aumento significativo en el porcentaje de fibroblastos Rat-1 en la fase S en 12 y 48 h, mientras que una disminución del 30% en la de la fase S, se ha observado 72 h después de la exposición a campos electromagnéticos, en comparación con los controles [Wolf et al., 2005]. Curiosamente, los últimos autores también encontraron un aumento significativo en ambas roturas de la cadena de ADN y los niveles de 8-OHdG, que alcanzó valores máximos después de los picos de la fase S [Wolf et al., 2005].

Se ha visto que el tratamiento de RF-CEM, puede detener las células en la fase G2/M en células de neuroblastoma humano [Buttiglione et al., 2007]. Usando RF-CEM y microscopía confocal de barrido láser, Zimmerman, ha encontrado más de un 60% de deficiencia en la formación del huso mitótico en las células HepG2 y en el carcinoma hepatocelular (HCC), al compararlas con células que

no han sido expuestas a CEM [Zimmerman et al., 2011]. Sin embargo, Ruiz-Gómez, encontró patrones similares en el ciclo celular, tanto de líneas celulares de carcinoma de colon como de leucemia, expuestos y no expuestos a CEM de 25 Hz [Ruiz-Gómez et al., 2001].

2.6. Apoptosis

El tamaño de los órganos depende fundamentalmente de su masa celular que, a su vez, viene determinado por el número y el tamaño de las células que forman parte del mismo. El número de células está muy regulado y se establece por el equilibrio entre los procesos de división y muerte celulares. El tamaño de los órganos estaría, por tanto, determinado por tres procesos fundamentales, regulados de forma independiente tanto por programas intracelulares como por moléculas de señalización extracelular que son la proliferación, la supervivencia y muerte celular. La mayoría de las células poseen la capacidad de activar un tipo de muerte conocida como muerte celular programada o apoptosis.

La apoptosis se inicia tanto por rutas extrínsecas mediadas por receptores de muerte como por intrínsecas a través de mitocondrias (**figura 5**). Con independencia de la vía de activación, intrínseca o extrínseca, este tipo de muerte se lleva a cabo gracias a la participación de una familia de enzimas con actividad proteasa denominadas caspasas que se elaboran como precursores inactivos. Las células necesitan señales específicas y correctas para que la apoptosis se realice solo donde sea necesario [Alberts et al., 1999].

Con independencia del estímulo que la inicia, la vía intrínseca de activación de apoptosis es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y de la liberación de moléculas pro-apoptóticas tales como la citocromo c hacia el citoplasma. Los CMs afectan la ruta intrínseca pues modifican varios procesos fisiológicos importantes relacionados con el potencial de membrana mitocondrial, tales como la síntesis de ATP, flujo de Ca^{2+} y la liberación del citocromo c al citosol [Gorczyńska et al., 1991].

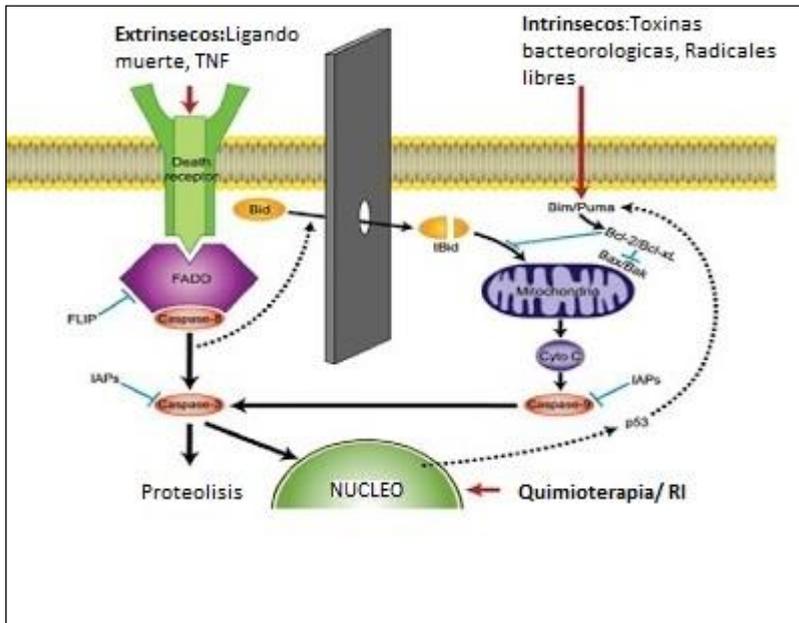


Figura 5: Apoptosis. Tomada y modificada de Kumar (Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 8th Edition)

Por lo tanto, el citocromo c se une a factor activador de la apoptosis-1 (Apaf-1) y a ATP para crear el apoptosoma, capaz de desencadenar la inducción de la apoptosis a través de la caspasa [Reubold et al., 2012]. Las alteraciones del huso mitótico también contribuyen a la iniciación de la apoptosis. Por lo tanto, después de la exposición a los CEM y dado que estos modifican el huso mitótico, podrían esperarse cambios en la tasa de apoptosis [Simkó et al., 2004]. Focke observó un ligero aumento en el porcentaje de células apoptóticas después de la exposición a los CEM intermitentes [Focke et al., 2010]. Los ELF-CEM también inducen la apoptosis en líneas celulares tumorales [Tofani et al., 2001].

En la mayoría de tipos de células, la RF-CEM aumenta la expresión de Egr-1, un fuerte activador de la transcripción de los genes clave implicados en la vía de la muerte celular [Buttiglione et al., 2007].

La concentración de la proteína Bcl-2 disminuye y aumenta la tasa de apoptosis después de la exposición a RF-EMF de células de neuroblastoma humano [Buttiglione et al., 2007]. Los MW-CEM también inducen apoptosis dependiendo del tiempo de exposición de la corriente en células de cáncer epidermoide humano [Caraglia et al., 2005]. Existen evidencias de que los componentes del sistema activador del plasminógeno (PA) de alguna manera están involucrados en procesos de muerte celular. Se ha sugerido que el plasminógeno puede estar vinculado a la apoptosis mediada por

cicloheximida (CHX) [O'Mullane et al., 1999], lo que aumenta drásticamente la tasa de apoptosis inducida por CHX. Por otra parte, el sistema activador de plasminógeno podría desempeñar un papel importante en la apoptosis inducida por acción de los CMs a través del aumento de la cantidad del activador del plasminógeno uroquinasa (uPA) [O'Mullane et al., 1999].

Girgert, sugirió que las células de cáncer de mama (MCF-7) expuestas a los CMs (50 Hz-1,2 μ T:0,012 G) pueden aumentar su potencial de metástasis, al influir estos sobre el sistema activador del plasmíogen (uPA) [Girgert et al., 2009].

Se ha atribuido un papel a la proteína p38 en la inducción de la apoptosis después de la exposición a CMs, Kim et al., han descrito que p38 sólo se activa tras la exposición (60 Hz y 6 mT: 60 G) de CM durante 30 minutos cada 24 h, durante tres días. Esta activación se ha encontrado después de exponer durante 48 h y 72 h a células HeLa y fibroblastos de pulmón IMP90, respectivamente. Estos resultados sugieren que la exposición repetitiva a una pequeña dosis de CEM podría inducir estrés y conducir a la activación de p38 y otras vías de señalización relacionadas con la apoptosis [Kim et al., 2010].

3.- CMs COMO TRATAMIENTO COADYUVANTE DE LA RT

Los CEM, desde el punto de vista clínico, han sido tradicionalmente utilizados en Medicina Física para estimular curaciones de fracturas óseas, y para mitigar el dolor crónico o

edema [Kovacic et al., 2010]. Sin embargo, los efectos biológicos del tratamiento con CEM no se conocen con exactitud por lo que, en gran medida, se desconocen las diferentes posibilidades de aplicación en otras áreas de la medicina, tales como el tratamiento del cáncer [Cameron et al., 2005, Wen et al., 2011].

El cáncer es, junto con las enfermedades infecciosas y las cardiopatías, una de las principales causas de muerte en los seres humanos. El cáncer resulta como consecuencia de una mala regulación del ciclo celular [Alberts et al., 1999]. Como hemos comentado anteriormente, el cuerpo humano se rige por un sistema de renovación celular, que debe realizarse en su justa medida y en tiempo determinado. Cuando se producen alteraciones en los genes y se transcribe la información de manera incorrecta (una célula sobrevive y se divide cuando no debería y produce células hijas que se comportan de la misma manera errónea) se pierde el control, y las células anormales se expanden dando lugar al cáncer.

3.1.- Carcinogénesis

El cáncer es básicamente una enfermedad genética, porque se produce como consecuencia de cambios patológicos en la información codificada en los genes que forman parte de la molécula ADN. El cáncer puede aparecer por la exposición a radiaciones ionizantes o sustancias químicas cancerígenas, y carcinógenos medioambientales que producen mutaciones (cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN). El cáncer se puede iniciar de

forma espontánea por alteración en los sistemas complejos encargados de la replicación y reparación del ADN. Las mutaciones espontaneas se desarrollan a una velocidad estimada de alrededor 10^{-6} o 10^{-7} mutaciones por gen por cada división celular, incluso en ausencia de estimulación de mutágenos externos. En un cuerpo humano se producen 10^6 divisiones celulares durante toda la vida, en una persona, cada gen individual puede sufrir mutaciones en más de 10^8 ocasiones diferentes. Por ello se necesita más de una mutación individual para que una sola célula normal se transforme en cancerosa, estas mutaciones se hacen de forma secuencial, por lo general durante un proceso que dura años. Además, estas células también son genéticamente inestables, esto interfiere sobre la replicación precisa del genoma. En consecuencia, se aumentan la tasa de mutaciones, disminuye la eficacia de reparación del ADN, aumenta el desarrollo de cortes y reordenamientos en los cromosomas que producen un cariotipo anormal e inestable.

3.1.1 Genes implicados en el desarrollo del cáncer

Los oncogenes y los genes supresores de tumores desempeñan un papel fundamental en el proceso de carcinogénesis. Los protooncogenes promueven el crecimiento de células normales. Los protooncogenes codifican para proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, receptores, factores de transcripción, etcétera, todos ellos con la función de estimular la proliferación celular. Ocasionalmente, cualquier alteración en éstos puede conducir a un

aumento de su expresión. Cuando los protooncogenes se alteran, se transforman en oncogenes y participan en un crecimiento celular no controlado. Los protooncogenes y los genes supresores de tumores, son de varios tipos y representan diferentes y numerosas alteraciones del comportamiento que pueden expresar las células cancerosas. Algunos de estos genes codifican factores de crecimiento, receptores, otros codifican proteínas reparadoras del DNA, mediadores de la respuesta a la lesión del DNA, como p53, o reguladores del ciclo celular o del programa de muerte celular [Alberts et al., 1999].

El cáncer se puede producir por una expresión aumentada de oncogenes en este caso solo necesita de una copia alterada del gen para dar lugar a una ganancia de función del mismo. En condiciones normales, los genes supresores de tumores funcionan como reguladores negativos del crecimiento y cuando no están presentes en la célula o se encuentran inactivos por diferentes causas (mutación o hipermutación de la región promotora del gen), las células dejan de crecer y proliferan anormalmente, pues la falta de actividad de éstos disminuye su capacidad para detener el crecimiento de las células. En este caso es necesario que ambas copias del gen estén afectadas para que se produzca una pérdida de la función del mismo. Entre los genes supresores de tumores se encuentran aquellos que regulan la muerte por apoptosis, la adhesión celular o las rutas de señalización del daño originado en el ADN. Alteraciones originadas en ambos tipos de genes conllevan a

una mayor proliferación y supervivencia celulares, de manera que conocer las funciones desempeñadas por estos genes puede ayudar a comprender los mecanismos biológicos y moleculares que se relacionan con el desarrollo del tumor, que incluyen la mala regulación de la apoptosis, el ciclo celular, la adhesión celular y el daño en la molécula de ADN causado por distintos agentes así como su reparación [Alberts et al., 1999].

Uno de los genes supresores de tumores más importantes y que aparece alterado en la mayoría de tumores humanos es el gen p53, conocido como "el guardián del genoma". Este gen que sintetiza una proteína que lleva el mismo nombre, se activa cuando la célula se va a dividir, y vigila que exista una secuencia normal en el ciclo celular para una proliferación celular correcta. Si el material genético de la célula se daña o si algún sistema de control se desajusta, p53 lo detecta e intenta restaurarlo. Si la lesión no es grave, la p53 detiene la división celular y activa los genes reparadores del ADN. Si el daño es irreparable, p53 induce la apoptosis. La relevancia de este gen está en que si sufre alguna alteración, impide que la célula muera por apoptosis y ni tampoco reparará los daños en el ADN, con lo cual, se inicia el proceso tumoral [Hernandez et al., 2001]. El estudio de la proteína P53, tanto mutada como salvaje, va encaminado a realizar futuros tratamientos más específicos para maximizar la muerte de las células tumorales, y conseguir mayor protección en células normales [El-Deiry et al., 2003].

El primer gen supresor de tumores que codifica para la proteína del retinoblastoma (RB), que desempeña un papel importante durante la primera parte de la fase G1 del ciclo celular. En este período, esta proteína se une al factor de la transcripción E2F (necesario para el inicio de la fase S). Por lo tanto, si hay lesión, el RB, mediante el secuestro de este factor de la transcripción, impide que la fase S comience. Además, el complejo E2F-RB reprime la transcripción de otros genes [Hernandez et al., 2001].

3.2.- Efecto genotóxico de la radiación ionizante (RI)

3.2.1.- Interacción de la radiación con los sistemas biológicos

La Radioterapia (RT) está considerada como uno de los tratamientos más efectivos contra el cáncer, y más de la mitad de pacientes con cáncer reciben Radioterapia, siendo este tratamiento una alternativa a la cirugía, sobre todo en aquellos tumores que no han metastatizado. La Radiobiología estudia la acción de la radiación ionizante sobre los sistemas biológicos, ayuda a entender los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la respuesta del tejido sano y tumoral a la radiación. En segundo lugar, ha contribuido al desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento con radiación para conseguir aplicar el mejor esquema terapéutico a cada paciente en particular [Jioner et al., 2009]. La radiación ionizante aplicada en los sistemas biológicos, provoca una serie de cambios físicos y químicos en los mismos, que tienen lugar de forma secuencial en el tiempo, conocidas como etapas de la acción biológica de la radiación

que aparecen resumidas en la **figura 6** y que se describen a continuación:

Fase física se desarrolla como resultado de la cesión de energía procedente de la radiación a los electrones de los orbitales atómicos de la célula del tejido expuesto y, como consecuencia, se produce una expulsión de algunos de estos electrones a niveles más altos de energía (excitación) y, por lo tanto, origina una excitación del átomo. Si la energía absorbida por electrones corticales es elevada puede ocurrir que éstos salgan del átomo quedando éste ionizado. Estos electrones secundarios pueden excitar o ionizar a otros átomos cercanos dando lugar a una cascada de ionizaciones.

Fase química comienza de forma rápida, tras los procesos de excitación e ionización y provoca rotura de los enlaces químicos en las moléculas, dando lugar a la formación de "radicales libres". Estos intervienen en una sucesión de reacciones que pueden o no conducir a restaurar el equilibrio de electrones.

Fase Biológica: esta fase comienza con las reacciones enzimáticas que actúan tras el daño químico residual.

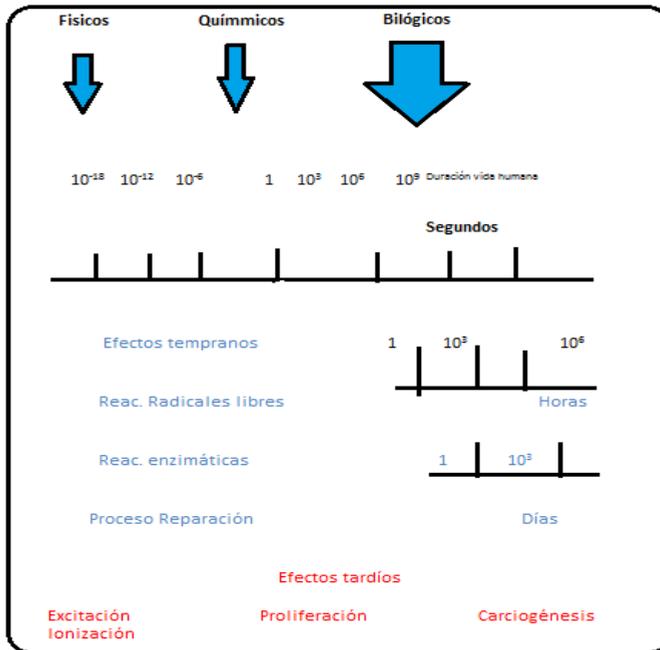


Figura 6: Cambios fisiológicos tras la irradiación. Tomada y modificada Radiobiología [Joiner 2009].

La gran mayoría de las lesiones originadas por la radiación en el ADN, se reparan con éxito pero aquellas no reparadas pueden conducir a la muerte celular. Las células, tienen un tiempo para reparar el daño tras la exposición a la radiación durante el cual, incluso pueden seguir dividiéndose después de la irradiación. La primera manifestación de lesión a nivel biológico es la muerte de las células madre y la pérdida de las células de tejido sano que aparece durante las primeras semanas y meses después de la exposición a la

radiación. Por ejemplo: rotura de la piel o la mucosa, daño hematopoyético. Un efecto secundario de la destrucción celular es la proliferación de células, compensando la muerte celular por irradiación, tanto de células tumorales como células sanas, por ejemplo fibrosis y telangiectasia, etc.

3.2.2.- Radiación ionizante: daño en el ADN

La radiación electromagnética de elevada energía tiene la capacidad de producir ionización y se conoce como radiación ionizante (RI). Los aceleradores lineales pueden generar fotones con las energías típicas que oscilan desde menos de 100 keV a varios MeV. Los efectos de la RI dependen de la zona del cuerpo que se esté tratando, así pues, existen células más sensibles que, generalmente, poseen menor capacidad para reparar el daño y muestran mayor radiosensibilidad tras la irradiación [Bayo et al., 2001]. Una célula es más radiosensible:

- Cuanto mayor sea su actividad reproductiva.
- Cuantas más divisiones deba realizar para adoptar una forma y funciones definitivas.
- Cuanto menos diferenciadas estén sus funciones.

Cuando se irradia una zona puede producir daño de forma directa, sobre los componentes de la molécula del ADN. La acción indirecta de la RI se desencadena por la absorción de la energía en las

moléculas de agua, provocando su disociación (radiólisis) y como resultado se liberan iones H y radicales libres H* y OH*, radical libre más involucrado en muerte celular, provocando, entre otras lesiones, roturas de la cadena de ADN (simples o dobles). El oxígeno potencia la formación de radicales libres, por ello el daño causado por la radiación se acentúa cuando se irradia en presencia de éste. Los tumores que presentan un alto porcentaje de células hipóxicas responden peor al tratamiento con radiación y esto provoca que los que tengan peor pronóstico que los que están bien oxigenados [Bayo et al., 2001]. También, ha sido descrito que el radical NO ejerce también un importante papel radiosensibilizador. En aquellos tumores malignos, la actividad de SOD es mayor respecto a los tumores benignos de mama, lo cual parece indicar que el exceso de ROS puede ser carcinogénico [Rios-Arrabal et al., 2013].

Como ya hemos comentado, las moléculas ionizadas son muy reactivas y se someten a una serie de cambios químicos, que pueden conducir a la ruptura de los enlaces químicos, y a nivel del ADN da lugar a graves consecuencias si no se repara adecuadamente a tiempo.

La absorción de energía procedente de la radiación por las células causa daño en todas las moléculas de éstas. Sin embargo, como hay varias copias de la mayoría de las moléculas intracelulares (agua, el ARNm, y proteínas), en ellas se lleva a cabo a un rápido y continuo proceso de detección y reparación del daño. El ADN

(molécula fundamental en todas las funciones celulares) contiene tan solo dos copias, y al ser de gran tamaño, la diana o el blanco para dañar es mayor, por lo tanto, la lesión en el ADN provocada por la radiación es más grave y a menudo letal para la célula [Joiner et al., 2009]. La radiación ionizante provoca distintos tipos de lesiones de las cuales la rotura de la doble cadena de ADN (RDC) es la más importante pues de no ser correctamente reparada, se asocia, con bastante frecuencia, a la muerte de la célula. Diferentes autores han descrito un aumento lineal del número de RDC con la dosis de radiación absorbida. Aquellas roturas dobles de cadena de ADN que no hayan podido ser reparadas por las células pueden originar diferentes tipos de aberraciones que pueden ser estables (translocaciones e inversiones) e inestables (fragmentos acéntricos, cromosomas dicéntricos) cuya presencia afecta de diferente forma en la respuesta de las células a la radiación. La principal razón para la utilización del fraccionamiento en radioterapia se debe a que tras el empleo de la radiación, la reparación es mejor en los tejidos normales que en los tumorales, hecho que favorece su recuperación, siendo este efecto más acusado en aquellos tejidos normales de respuesta lenta que, en definitiva, son los que determinan los efectos tardíos o complicaciones encontradas tras el tratamiento con radioterapia. La dosis normalmente aplicada en fraccionamiento estándar es de 2 Gy porque disminuye la toxicidad y aumenta la supervivencia en células sanas. Se aplican dosis elevadas en tratamientos paliativos para reducir el tiempo en días de exposición. La sensibilidad celular varía en función de la fase del ciclo en la que se

encuentran las células en el momento de la exposición a la radiación. Las células son muy sensibles a la radiación en la fase M y poco sensibles en la fase S. Tras la irradiación celular, se acelera el proceso de repoblación tumoral debido a que se seleccionan las células tumorales más agresivas. Al aplicar de forma fraccionada el tratamiento, permitimos que entre las fracciones de dosis administradas, las células se distribuyan en las fases del ciclo en las que son más sensibles a la radiación. Este hecho permite tratar a aquellas células tumorales que no murieron con la primera dosis de radiación administrada y consiguieron pasar por el ciclo celular, disminuyendo de esta forma la repoblación [Huber et al., 2013].

Como se ha mencionado anteriormente, las células bien oxigenadas son más sensibles a la radiación. El fraccionamiento de la dosis permite la reoxigenación del tumor durante el tratamiento con radioterapia. Los vasos de los tumores son estructuralmente anómalos y además la masa tumoral los comprime. Esto conlleva a una mala oxigenación de las células tumorales y favorece el fenómeno de hipoxia tumoral crónica y aguda. Al fraccionar la dosis se reduce el tamaño del tumor, por lo que la vascularización de la masa tumoral residual es mejor y se favorece el aporte de oxígeno y nutrientes a las células. Por tanto, el proceso de reoxigenación reduce la proporción de células hipóxicas dentro del tumor y por ello mejora la respuesta a la radioterapia.

3.2.2.A.- Respuesta al daño del ADN

La respuesta que se desencadena tras el daño causado en el ADN, denominada como DDR (del inglés, DNA Damage Response) se lleva a cabo gracias a un gran número de proteínas que forman parte de es un sistema complejo que requiere de gran coordinación entre sus componentes y determina la respuesta celular final frente a las lesiones producidas por la radiación en la molécula del ADN. Este sistema de respuesta está integrado por diferentes rutas de señalización relacionadas entre sí que controlan diferentes aspectos celulares y las podemos agrupar en:

- Moléculas sensoras del daño originado en el ADN
- Moléculas efectoras de respuesta al daño.

Los sensores de daño en el ADN engloban a un grupo de proteínas que se encargan de supervisar la presencia de daño en el genoma y posteriormente actúan sobre las moléculas efectoras, que finalmente, están implicadas en rutas relacionadas con la muerte celular programada o apoptosis, con la reparación del daño y con la parada en los diferentes puntos de control del ciclo celular.

3.2.2.B.- Moléculas sensoras del daño

La respuesta celular inicial a la doble rotura de cadena del ADN (RDC) se caracteriza por el reclutamiento de un gran número de diferentes proteínas hacia los lugares dañados en el ADN. Estos sitios

se conocen como “foci inducidos por radiación ionizante”. Uno de los primeros acontecimientos que ocurren cuando se desencadena la respuesta al daño por radiación es la fosforilación de la histona H2AX (variante de la histona H2A que forma parte del nucleosoma) en el lugar donde se localiza la RDC. Las células en las que esta proteína está ausente o no funciona correctamente muestran una respuesta reducida al daño inducido por radiación y, por tanto, elevada radiosensibilidad. La presencia de histona H2AX fosforilada, conocida como γ H2AX, es un método muy sensible empleado para detectar tanto las RDCs inducidas por radiación como su reparación. Las principales quinasas encargadas de fosforilar esta histona son la proteína mutada de la ataxia telangiectasia [ATM], la proteína-quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs) y la quinasa relacionada con ataxia telangiectasia (ATR).

3.2.2.C.- Moléculas efectoras del daño

Las quinasas ATM, DNA-PKcs, y ATR, fosforilan no sólo a la histona H2Ax, sino también a un gran número de proteínas que transmiten un conjunto de señales que, finalmente, influyen en la activación de las diferentes rutas intracelulares (apoptosis, parada en el ciclo celular y reparación del daño en el ADN) que determinan la respuesta global de la célula a la radiación.

3.2.2.D.- Muerte celular programada: apoptosis

La proteína p53 es fosforilada por ATM después del daño originado por radiación. Esta modificación impide la unión de p53 a la proteína MDM2 y su posterior degradación por ésta. Además, esta fosforilación de p53 conduce a su activación como factor de transcripción aumentando la expresión de numerosos genes entre los que se encuentran BAX y PUMA, genes pro-apoptóticos que, en algunas células, son capaces de inducir la apoptosis cuando el daño causado por radiación es muy elevado y no compensa repararlo. La inducción de este tipo de muerte es especialmente importante en tejidos de proliferación rápida que, de hecho, muestran un alto porcentaje de muerte por apoptosis. **Apartado 2.6.**

3. 2.2.E.- Puntos de control del ciclo celular y radiosensibilidad

Uno de los efectos más importantes de la radiación sobre las células es el retraso de éstas en las distintas fases del ciclo celular. Estos retrasos para avanzar a lo largo del ciclo se deben a la activación de los puntos de control del daño en el ADN, que son puntos específicos a lo largo del ciclo en los cuales se retrasa o se bloquea la progresión de las células a la fase siguiente. La respuesta al daño en el ADN originado por radiación pone en marcha cuatro puntos de control diferentes que permiten que las células tengan más tiempo para reparar las lesiones producidas por este agente físico y que aparecen resumidos en la **figura 7**. En las células tumorales, debido a los cambios genéticos que se producen durante

la génesis tumoral, uno o más puntos de control de la fase G1 / S, S, y G2 están modificados y no funcionan correctamente. Estas respuestas de los puntos de control, se han relacionado con la función de genes supresores de tumores que se ve alterada y de esta manera, se permite la proliferación inducida por oncogenes que inducen la replicación inadecuada del ADN dañado.

FASES CICLO	Proteínas Señalización	Fase durante la RI	Características
G1	ATM/p21/p53	G1	Previene entrar en S
S	ATM/Chk1-2/ CDC25A-C/BRCA1-2	S	Progresion lenta a S
G2(F. Temprana)	ATM/p21/p53 ATM/Chk1-2/ CDC25A-C/BRCA1-2	G2	Previene entrar en mitosis
G2(F. tardía)	ATR/Chk1/CDC25A-C	Todas las fases	Acúmulo de células en G2

Figura 7: Puntos de control (tomada y modificada Joiner) [Joiner et al., 2009].

El buen funcionamiento de los puntos de control del ciclo celular evita la proliferación de estas células y previene el desarrollo del tumor. Alteraciones en genes tales como p53 y BRCA1, y otros implicados en la respuesta al daño ocasionado en el ADN tras irradiación que, además, influyen en la activación de los diferentes puntos de control pueden dar lugar a una mala regulación de los mismos. Todo ello tiene importantes repercusiones en la inestabilidad genética tras la exposición a radiación y en la progresión tumoral, sin embargo, existen pocas evidencias para sugerir que la

mala regulación de estos puntos de control influyan en la radiosensibilidad celular. Esto es debido a que las paradas en los puntos de control G1/S, S y al principio de G2, proporcionan a las células tiempo extra que es de gran importancia para que la reparación se lleve a cabo eficazmente y no para que se reparen mayor cantidad de lesiones ocasionadas por la radiación. La parada del ciclo que se lleva a cabo al final de la fase G2 es la única a la que se le ha atribuido un papel a la hora de determinar la radiosensibilidad celular. Así, todas aquellas células que se encuentran al final de la fase G2 y entran en mitosis de forma prematura presentan mayor porcentaje de muerte celular tras irradiación. En el caso de fraccionamiento si es importante considerar las paradas en los puntos G1/S, S y al principio de G2 y su influencia en la radiosensibilidad celular. La mala regulación de estos puntos de control en las células tumorales, afectará al fenómeno de redistribución de éstas a lo largo del ciclo tras la irradiación y por tanto a la sensibilidad de las células a dosis subsecuentes de radiación [Joiner et al., 2009].

3.2.2.F.-Reparación del daño producido por radiación

Los dos mecanismos fundamentales implicados en la reparación del daño producido tras la exposición a la radiación, concretamente del tipo de lesión antes explicado como la RDC, son la reparación homóloga y el mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos. Las proteínas que participan en cada una de

estas rutas son, en gran parte, distintas y además estos mecanismos se diferencian en la fase del ciclo celular en la que se ponen en marcha y en la fidelidad con la que se lleva a cabo la reparación. Alteraciones en estas rutas de reparación están relacionadas con la radiosensibilidad que presentan las células.

4. EFECTOS IN VITRO DE LOS CEM Y LA RI

Aunque los ELF-CEM no transmiten la energía suficiente como para romper los enlaces químicos de la molécula de ADN, si pueden afectar al porcentaje de muerte celular como consecuencia del daño causado en el ADN inducido por el estrés oxidativo, actuando los radicales libres generados en esta situación de estrés como carcinógenos al inducir inestabilidad del ADN. Sin embargo, hasta la fecha, pocos estudios se han realizado para evaluar el papel potencial de los campos electromagnéticos en el tratamiento con radioterapia.

En 1999, Miyakoshi , sugirió que los CMs aumentaban la tasa de mutación encontrada en la molécula de ADN al exponerla a rayos X en células de ovario, indican que la exposición a largo plazo a CEM de baja frecuencia con una intensidad de 5 mT (50 G) no aumenta la frecuencia de mutaciones, pero si se aprecia un incremento de la misma, cuando se aplican conjuntamente la RI y los CEM de baja frecuencia [Miyakoshi et al., 1999]. Ding, observó en la línea celular MCF-7, que tras la exposición a CMs (60 Hz 5 mT: 50 G) no afecto a la distribución del ciclo celular. [Ding et al., 2000]. Otros autores han

descrito la capacidad mutagénica de CEM de baja frecuencia (50Hz 1 mT: 10 G, 12H) estudiando el daño en el ADN en secuencias asociadas a microsatélites, y se observó que el empleo de estos campos puede potenciar la tasa de mutación encontrada tras la de exposición a radiación ionizante en las células de glioma [Mairs et al., 2007]. Estudios realizados en linfocitos de sangre periférica humana ponen de manifiesto que la exposición a CM (50 Hz 2.500 μ T) por sí solos, no influyen significativamente en la formación de aberraciones cromosómicas. Por el contrario, al realizar un tratamiento combinado con radiación ionizante y CM con intensidad de 88: 0,88 G μ T, se observó un incremento significativo de aberraciones cromosómicas, comparado con el tratamiento único de RI [Maes et al., 2000].

Las anomalías en la formación del huso mitótico tradicionalmente se han asociado con un aumento de las tasas de apoptosis y, por lo tanto, con la radiosensibilidad celular [Joiner et al., 2009]. Los campos electromagnéticos pueden influir en la polimerización de microtúbulos aumentando significativamente las tasas de apoptosis observadas tras la exposición a rayos-X. [Ding et al., 2003]. La pérdida de cromosomas se ha atribuido generalmente a un mal funcionamiento del huso mitótico, frecuentemente relacionado con alteraciones de los microtúbulos [Ding et al., 2003].

En este sentido Ding, puso de manifiesto que las células irradiadas, previamente expuestas a ELF-MFS presentan mayor número de micronúcleos en comparación con las células irradiadas

no expuestas [Ding et al., 2003]. Resultados similares han sido descritos por Lagroye, utilizando campos electromagnéticos y radiaciones gamma [Lagroye et al., 1997]. Los efectos sinérgicos parecen ser la explicación más plausible del empleo de los campos electromagnéticos en RT. Varios estudios han investigado la capacidad de ELF-CEM para aumentar la citotoxicidad y la genotoxicidad inducidas por la radiación [Manti et al., 2010]. Stronati estudió in vitro, la genotoxicidad derivada tras la exposición a CEM (50 Hz 1 mT: 10 G 2h) en linfocitos humanos. Los resultados revelan, que no hubo cambios (aberraciones cromosómicas, micronúcleos) en las células tratadas respecto a su grupo control. También se evaluaron los efectos tras la aplicación de CM y RI y tampoco se observaron cambios significativos en cuanto a la genotoxicidad, aunque si se obtuvo una ligera disminución en la proliferación celular, tanto en la exposición solo a CEM como en la combinación de ambos tratamientos [Stronati et al., 2004]. Otros autores han puesto de manifiesto que la combinación de los CEM con radiación ionizante (1,5 y 3 Gy RI) no provocan un incremento en la genotoxicidad [Ansari et al., 2000].

La existencia de efectos cooperativos entre los campos electromagnéticos y los rayos X en la inducción de tasa de apoptosis en una línea celular de cáncer de hígado también se ha demostrado [Jian et al., 2009]. Egr-1 parece desempeñar un papel fundamental para inducir una mayor tasa de apoptosis cuando las células son expuestas a los campos electromagnéticos y a la radiación ionizante

[Ahmed et al., 1997,2004, Buttiglione et al., 2007]. Por otra parte, se ha atribuido un papel radiosensibilizador a Egr-1 en células de melanoma [Ahmed et al., 1996]. Se ha descrito que la exposición repetida a un campo magnético variable en el tiempo induce apoptosis mediada por p38, una proteína de la familia MAP Kinasa en las células humanas normales y el cáncer [Kim et al., 2010]. La actividad de P38 mejora después de la exposición a la radiación ionizante [Wood et al., 2009, Wang et al., 2011, De la Cruz-Morcillo et al., 2011, Dickinson et al., 2011]. De la Cruz-Morcillo, ha puesto de manifiesto recientemente que la radiación ionizante activa a p38 de una manera dependiente de p53, y que la activación del eje de señalización MKK6/3-p38MAPK-p53 conduce a la apoptosis [De la Cruz-Morcillo et al., 2011]. Además, se ha sugerido, un importante grado de implicación de p38 en la radiosensibilidad celular [De la Cruz-Morcillo et al., 2013]. La activación de p38 también se ha relacionado con la parada en la fase G2/M producida por radiación [Wang et al., 2000]. Todos estos resultados reflejan la existencia de efectos sinérgicos de la radiación ionizante y de los CEM en la radiosensibilidad mediada por la proteína p38. La Radiosensibilidad también depende de la fase del ciclo de en la que se encuentran las células durante la exposición a la radiación ionizante. Se ha demostrado que las células irradiadas durante la fase G2/M, son más radiosensibles que cuando esto tiene lugar en otras fases del ciclo celular [Jeggio et al., 2009]. Por lo tanto, los campos electromagnéticos que causan detención de las células en la fase

G2/M también podrían ser útiles en la radiosensibilización de las células tumorales [Wolf et al 2005, Buttiglione et al., 2007].

5.- EFECTOS IN VIVO DE LOS CEM Y RI

Conceptualmente, el control local del tumor es otra variable de interés en la investigación clínica y experimental encaminada a la mejora de la eficacia de RT. Un tumor se controla localmente cuando todas sus células clonogénicas (es decir, las células con la capacidad para proliferar y para causar la recurrencia después de la radioterapia) han sido inactivadas [Joiner et al 2009]. El beneficio terapéutico requeriría un efecto diferencial entre las células tumorales y el tejido normal con el fin de permitir una mayor eficacia de la radioterapia sin aumento de la toxicidad.

En este sentido, Wolf, demostró diferencias en el daño del ADN después de la exposición a campos electromagnéticos de baja frecuencia, tanto en células normales como en tumorales. Estos autores describieron que el mayor nivel de daño en el ADN en las células neoplásicas se asocia con defectos en los mecanismos de reparación, una característica común de las células tumorales. Además, demostraron que el tratamiento antioxidante (α -tocoferol a 10 mM) impide la estimulación de la proliferación celular en las células normales, pero no en las células tumorales [Wolf et al 2005].

Diferencias en el daño del ADN también se han descrito para las células normales y tumorales después de este tratamiento

antioxidante. Estos resultados muestran un efecto tras exposición a los EMF que es diferente en las células tumorales y normales. Teniendo en cuenta las deficiencias en reparación observadas en las células tumorales, este efecto diferencial podría extenderse al tratamiento con radiación ionizante, que apoya la idea de que la respuesta de las células expuestas a la radiación ionizante puede ser potenciada por los CEM.

Experimentos llevados a cabo en ratones implantados con células de hepatoma, han demostrado que cinco períodos de exposición a CEM de 100 Hz de frecuencia, combinados con 4 Gy de rayos X aumentan la supervivencia global inhibiendo el tamaño del tumor, en comparación con el empleo exclusivo de MF o rayos X [Wen et al., 2011], sugiriendo un efecto sinérgico de ambos tratamientos. Efecto que ha sido también documentado por otros autores a través del aumento de especies reactivas de oxígeno y posterior activación de respuesta a estrés [Simkó et al., 2004, Cao et al., 2009]

Lo que aún no está claramente demostrado y en este sentido existe controversia en los trabajos publicados es si la aplicación de los CEM debe de ser antes o después de la irradiación [Koyama et al., 2005].

Cameron, ha observado un efecto sinérgico de los CEM y la radiación ionizante que ocasiona una reducción de la tasa de la tasa de crecimiento de xenotransplantes de cáncer de mama en ratones

[Cameron et al., 2005]. También informaron de que el uso diario continuado de los CEM después del tratamiento radiación ionizante impide el aumento de la densidad de vasos sanguíneos tumorales, en comparación con los ratones que recibieron solamente la terapia de radiación ionizante. La terapia con radiación ionizante interfiere inicialmente con la vascularización del tumor, esto conlleva a la hipoxia del mismo, lo que, a su vez, aumenta la radio-resistencia de las células tumorales. Estas áreas hipóxicas producen HIF-1, que estimula la producción de factores angiogénicos que favorecen el crecimiento posterior del tumor. Esta secuencia conocida de eventos que tienen lugar después del tratamiento de radiación ionizante, ha llevado a los investigadores a considerar los programas de tratamiento de radiación ionizante, junto con el uso de agentes anti-angiogénicos.

Cameron, mostró que la terapia con CEM diarios aplicada a los ratones tratados con radiación ionizante impide el aumento de la densidad vascular en el tumor, lo que retarda su vascularización, crecimiento y metástasis [Cameron et al., 2005].

6.- CEM Y CÁNCER DE MAMA (MCF-7 y MDA-MB-231)

En España se diagnostican unos 22.000 casos al año de cáncer de mama, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65., es por esto la gran necesidad de encontrar una terapia

adecuada para su tratamiento, ya que a veces ni tan si quiera la radioterapia la quimioterapia evitan recidivas y metástasis.

En el año 1994, Salvatore, observó que al exponer a CM a un carcinoma estabilizado de células MCF-7 (cáncer de mama), no se estimulaba el crecimiento celular. Además al combinar este tratamiento con quimioterapia, se aumentó la muerte de células neoplásicas, por lo que es interesante investigar en profundidad la exposición a CMs combinado con otras terapias para el tratamiento del cáncer [Salvatore et al., 1994],

El cáncer de mama está asociado a una desarreglo de estrógenos, más concretamente se asocia con el receptor de estrógeno alfa (subtipo del positivo), este promueve el crecimiento, supervivencia del tumor e invasión de otros tejidos, a través del estímulo del factor de crecimiento vascular (VGEF).

Algunos atores han demostrado que el tratamiento con CM no estimula el crecimiento celular ni afecta la viabilidad en cáncer de mama, para ello aplicó los CMs en líneas celulares tumorales con receptor de estrógeno positivo (MCF-7) y en líneas celulares con receptor de estrógenos negativos (MDA-MB-231) y observo que sus datos no apoyan la hipótesis de que la exposición de células de cáncer de mama a CM estimule el crecimiento celular [Loberg et al., 2009].

Es interesante determinar si los CEM solo provocan citotoxicidad en las células tumorales, de ser cierto esto permitiría poder combinar tratamientos no invasivos con los ya existentes. En este sentido Crocetti ha estudiado la citotoxicidad en células tumorales (MCF-7) y sanas (MCF10) de mama, sometidas a CMs de diferentes frecuencias (20-50 Hz) e intensidades (20-50 G) durante un tiempo diferente (30-90 minutos). Sus resultados han puesto de manifiesto el efecto citotóxico de CMs de 20 Hz y 30 G aplicados durante 90 minutos y tres días consecutivos en células tumorales. Por el contrario, no se observó ningún efecto en las células MCF10 [Crocetti et al., 2013].

Aproximadamente el 40% de tumores de mama con receptor de estrógeno positivo, responden a la terapia antiestrogénica con tamoxifeno, este es un antiestrógeno parcial, es decir o estimula o inhibe el crecimiento del tumor y tejidos, dependiendo de su asociación entre el tumor y el ER+, por ejemplo, actúa como antagonista del estrógeno en mama y en hueso y en como agonista del estrógeno útero.

Lógicamente, impera la necesidad de investigar más sobre el tema para conocer con mayor precisión la implicación y combinación de los CEM, con estrógenos, melatonina y otras hormonas en el desarrollo del cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

7.-HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dada la controversia que existe actualmente en la literatura científica sobre la posible genotoxicidad de los CMs así como las alteraciones que éstos provocan sobre las diferentes estructuras celulares, consideramos de gran interés analizar los efectos que los CMs producen en diferentes modelos celulares, establecidos en cultivo, tras exposición exclusiva a éstos y combinados con el empleo de radiación ionizante (rayos X).

La hipótesis que se plantea en este trabajo de investigación es si los CMs pueden potenciar la respuesta al tratamiento con radiación ionizante en líneas celulares tumorales de cáncer de mama. De ser cierta, los CMs podrían ser utilizados como tratamiento coadyuvante para conseguir mayor efectividad de la radioterapia.

8.-OBJETIVOS

Los objetivos generales de este estudio, realizado en líneas celulares de cáncer de mama han sido:

1. Analizar la distribución celular en las distintas fases del ciclo (G1, S, G2/M), tras la aplicación exclusiva de CMs de baja frecuencia (25-100 Hz) y diferente Intensidad (10-100 G).
2. Estudiar la distribución celular en las diferentes fases del ciclo (G1, S, G2/M), tras la aplicación combinada de CMs (50 Hz/100 G) y radiación ionizante (2 Gy).
3. Determinar los niveles de ROS existentes tras el empleo combinado de CMs (50 Hz/100 G) y radiación ionizante, y comparar éstos con los producidos tras el tratamiento exclusivo con radiación ionizante.
4. Conocer la radiosensibilidad celular tras la exposición a CMs.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1.- Instrumentación

Para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado la instrumentación disponible en la unidad de apoyo a la investigación (UNAI) del Hospital Universitario San Cecilio de Granada que se detalla a continuación.

1.1.1.- Magnetomed 7100

Los campos magnéticos han sido generados mediante un equipo Magnetomed 7100 (**figura 8**), de aplicación clínica en el campo de la Medicina física y Rehabilitación (algias, fracturas, dolor fantasma, etc.) que además se puede usar en otras patologías fuera del ámbito del aparato locomotor (astenias, bronquitis, asma bronquial, diabetes, cólicos abdominales).



Figura 8. Magnetomed 7100

El aparato genera un campo magnético (CM) regulable en intensidad (desde 10 a 100 G con incrementos de 10 G) y en frecuencia (1 a 100 Hz). Este equipo consta de un cilindro de 50 cm de diámetro, que concentra la líneas de fuerza en el interior del solenoide (**figura 9**) con ayuda de un dispositivo especial (MFC) que reduce el valor de inducción magnética fuera del solenoide, de esta manera se evita que quede afectado por este campo todo aquello que esté localizado a una distancia de unos 50-60 cm. El MFC reduce la contaminación electromagnética en un 85%.

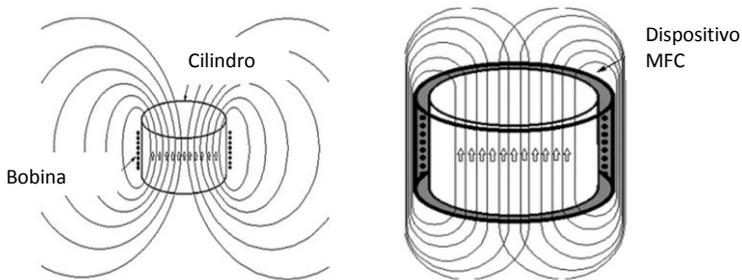


Figura 9. Corriente inducida por Magnetomed 7100

1.1.2.- Citómetro de flujo

El citómetro de flujo utilizado en este trabajo de tesis doctoral, es el modelo FACSAria II 2L (Láser 488nm y 633nm) (**figura 10**). Es un instrumento tecnológico que permite entre otras muchas aplicaciones, la medición simultánea de múltiples características físicas y químicas de células en suspensión, la

detección y cuantificación de células tumorales y antígenos, cuantificación de ácidos nucleicos, estudio del contenido proteico, la producción celular de radicales de oxígeno, etc. También se usa para identificar antígenos celulares mediante técnicas de inmunofluorescencia y el estudio del contenido de ADN y fases del ciclo celular.

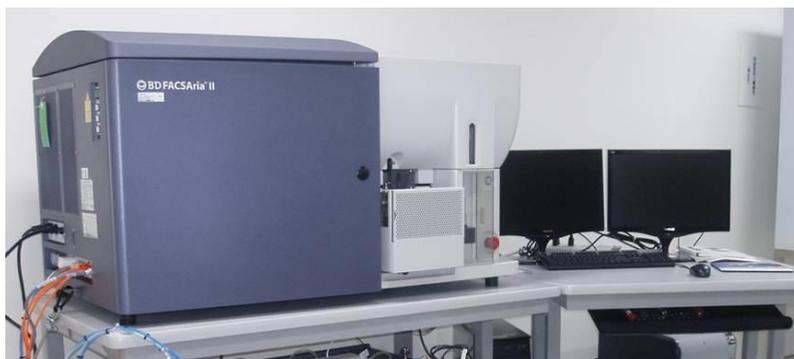


Figura 10. Citometro de flujo (BD FACS Aria II)

La intensidad de fluorescencia que se mide en el citómetro es proporcional a la cantidad de fluorocromo (macromoléculas que absorben la luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra), la imagen representada en el citómetro depende de la longitud de onda del láser empleado y de la emitida por el fluorocromo. Así el yoduro de propidio, que marca ácidos nucleicos, se excita a 493 nm y emite a 630 nm, de esta manera se puede determinar la cantidad de ADN que presenta una célula tal y como se muestra la **figura 11**.

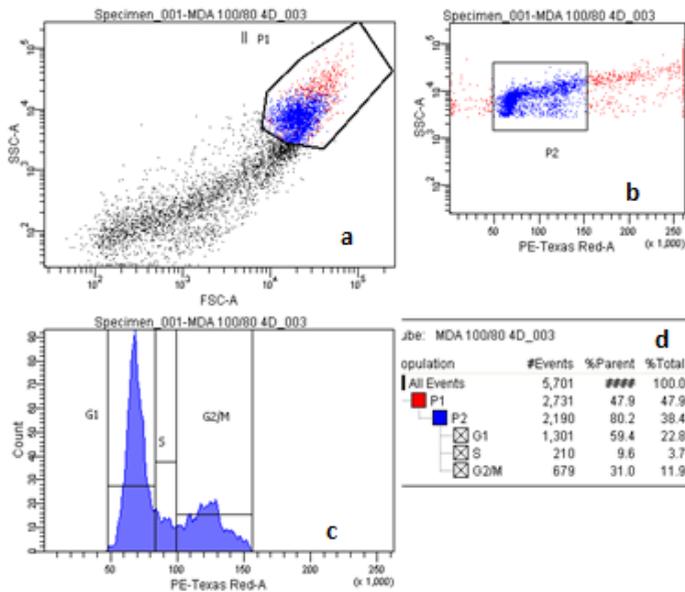


Figura 11. Representación gráfica de Citometría. Aplicación de CMs 100 Hz 80 G en la línea celular MDA-MB-231. El cuadrante **a** y el cuadrante **b**, corresponden a la población celular adquirida y la evaluada, respectivamente. El cuadrante **c**, muestra la gráfica que representa la distribución de las células en las fases del ciclo celular. El **d** indica los datos numéricos correspondientes a las mismas.

1.1.3.- Irradiador experimental

La irradiación de las células se ha llevado a cabo utilizando un equipo para animales de experimentación y cultivos celulares. (Yxlon Smart Maxishot 200-E). Se utiliza bajo unas condiciones de intensidad y potencia de 4.5 mA y 200 Kv, respectivamente. Este equipo está compuesto de una unidad tanque SMART 200 con tubo direccional refrigerado por aire con ventilador y con una potencia que oscila entre los 60 y los 200 Kv en pasos de 1 Kv.

El rango de mA va desde los 0,5 mA a los 4,5 mA en pasos de 0,1 mA. También contiene una unidad de control SMART 583, con pulsadores, uno de color verde, que indica el paso de corriente de Rayos X, y otro en rojo, cuando no hay paso de corriente. Un teclado para introducir y modificar diferentes parámetros entre los cuales se encuentra el tiempo, que depende de la dosis de radiación absorbida que vayamos aplicar, los Kv y los mA.

Esta cabina de rayos X está fabricada en forma de paneles de plomo laminado entre placas de acero. Todo ello montado en soporte de acero para facilitar su sujeción. Para la eliminación de fugas de radiación en irradiaciones sin colimador, se añadió una lámina de plomo en el solapamiento interior de la puerta. Las dimensiones son: 1030 mm de largo, 600 mm de ancho y 1015 + 850 mm (patas) de alto. También contiene un soporte para tubo bipolar de rayos X, monitor de radiación y diversos accesorios y mejoras como son un portamuestras regulable en altura, plataforma rotativa para mejorar la heterogeneidad del campo, aislamiento acústico del tubo y colimadores entre otros.

Este equipo de rayos x se encuentra ubicado en un área específica y concreta de instalaciones radiactivas de segunda categoría y bajo la inspección anual del Consejo de seguridad Nuclear con revisiones semanales y mensuales del servicio de radiofísica y protección radiológica y el supervisor de dicho área respectivamente, pertenecientes al Hospital Clínico Universitario San Cecilio.



Figura 12. Irradiador experimental Yxlon Smart Maxishot 200-E

1.1.4.- Microscopio IX51

Se ha utilizado un microscopio IX51 con contraste de contraste de fase avanzado que permite visualizar placas con varios pocillos y cultivos.



Figura 13. Microscopio IX51

1.1.5.- Centrifuga MIKRO 22R

Equipo que permite la centrifugación de tubos (0,2-50 ml) para la separación de constituyentes de mezclas líquidas o suspensiones. También permite la separación de células y macromoléculas.



Figura 14. Centrifuga MIKRO 22R

1.1.6.- Incubador Sanyo Co₂ MCO-20AIC

Para el mantenimiento del cultivo celular se ha utilizado un incubador, modelo Sanyo Co₂ MCO-20AIC (**figura 15**). Este incubador controla la contaminación gracias a que en su interior presenta una aleación de cobre-acero antibacteriano que ayuda a eliminar los mohos, esporas y otros derrames contaminantes. El calor directo que rodea la cámara permite la distribución uniforme de la temperatura. El incubador utilizado presenta unas dimensiones interiores de 490 x 523 x 665 mm y exteriores de 620 x 710 x 900 mm. Ofrece un rango de concentración de CO₂ del 0 al 20%, utilizando en cultivo celular el del 5%. El CO₂ es suministrado desde el exterior mediante conexión a una botella de gas CO₂. El Incubador, alcanza

temperaturas de hasta 50°C, manteniendo de forma constante, la temperatura de 37°C para cultivo celular, con una humedad del 95%, que se consigue con una bandeja (interior) con agua que incluye un sensor de nivel. Para garantizar la esterilidad, está provisto de una lámpara ultravioleta interna. Tienen doble sistema de seguridad, con una puerta de cristal que cierra el interior y otra puerta más que aísla del exterior, con un revestimiento aislante especial para el mantenimiento de las condiciones óptimas de cultivo celular.



Figura 15. Incubador MCO-20AIC

1.1.7.- *Cabina de flujo laminar. Telstar Bio-II-A/M*

Para el trabajo con el cultivo celular, se ha realizado bajo condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar modelo Telstar Bio-II-A/M, Class II Cabinet con certificado EN-12469-2000. Este tipo de campana nos permite controlar la contaminación microbiológica en el aire mediante la introducción

de aire estéril, tratado por medio de filtros absolutos HEPA, que evitan la entrada de partículas desde 0.3 micras en adelante y su diseño interno obliga a las partículas a detenerse en el medio filtrante, su alta eficiencia es de 99.99%. También introduce esa masa de aire ultrafiltrado en un ambiente confinado a velocidades muy bajas, con lo cual el aire avanza en una sola dirección tomando la forma de los objetos que se encuentran en el interior de la cabina y así se evita contaminación exterior y aquella que podría provenir de los objetos dentro de la zona de trabajo. Este equipo asegura protección al personal, al producto y al medio ambiente.



Figura 16. Cabina de seguridad Clase Bio-II-A/M

1.1.8.- Pipetas y pipeteros Eppendorf

La pipeta es un instrumento volumétrico de laboratorio que permite medir la alícuota de líquido con bastante precisión. Suelen ser de vidrio. Está formada por un tubo transparente que termina en una de sus puntas de forma cónica, y tiene una graduación (una serie de marcas grabadas) con la que se indican distintos volúmenes (0-10ml), tal y como muestra la **figura 17**.



Figura 17. Pipetas de cristal

La pipeta se usa con un pipetero automático, que es un instrumento de laboratorio que se utiliza para transvasar líquidos y constan de un regulador de velocidad de aspirado y dispensado, y además están provistos de un filtro hidrofóbico autoclavable que previene la sobre aspiración (**figura 18 a**). Algunas incluyen adaptadores intercambiables para varios tipos de puntas (vidrio o plásticas de hasta 100 ml). En la figura **18 b**, se muestra una pipeta automática de volúmenes pequeños (20 μ l a 1000 μ l) y de mayor precisión, que requiere de puntas para su uso (**figura 18 c**).



Figura 18. Pipetero automático(a), pipeta automática (b) y puntas de pipeta(c).

1.1.9.- Frascos de cultivo

Los frascos para cultivo celular están diseñados y tratados para promover la adherencia y crecimiento de las células. Fabricados en poliestireno, son estériles y con diferentes áreas de crecimiento de 25 cm² hasta 225 cm². La tapa de polietileno está diseñada para aplicaciones con intercambio de gases. Certificados libres de pirógenos. Todos los frascos son de forma rectangular, como se ve en la **figura 19**.



Figura 19. Frasco de cultivo

1.1.10.- Otros instrumentos utilizados:

- Baño termostático. –Mettler

1.2.- Líneas Celulares

La investigación de este trabajo se ha centrado en dos líneas celulares de cáncer de mama, obtenidas de la “american type culture collection”, ATCC que se describen a continuación.

1.2. a. -MCF7 (ATCC® HTB-22™)

Son células epiteliales humanas de cáncer de mama (adenocarcinoma), extraídas de un derrame pleural metastásico. Estas células expresan el receptor de estrógeno (ER α -positivo) y son nativas para el gen p53. Muestran baja expresión del gen HER2.

1.2. b. - MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

Son células epiteliales humanas de cáncer de mama (adenocarcinoma) extraídas de un derrame pleural metastásico, con el gen p53 mutado, ER α -negativo y baja expresión del gen HER2. Además estas células expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor transformante de crecimiento alfa (TGF α).

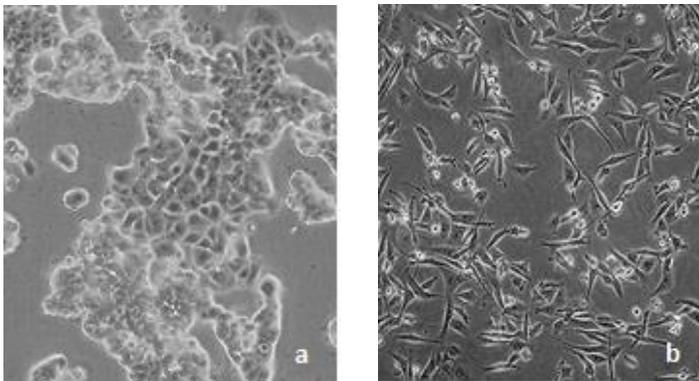


Figura 20: Líneas celulares a) MCF7 (ATCC® HTB-22™) y b) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™)

2.- Métodos

2.1.- Tratamiento de las células con CMs

Los campos magnéticos se han generado utilizando el dispositivo Magnetomed 7100 (descrito anteriormente). Las frecuencias e intensidades aplicadas a los cultivos celulares se detallan en la **figura 21**.

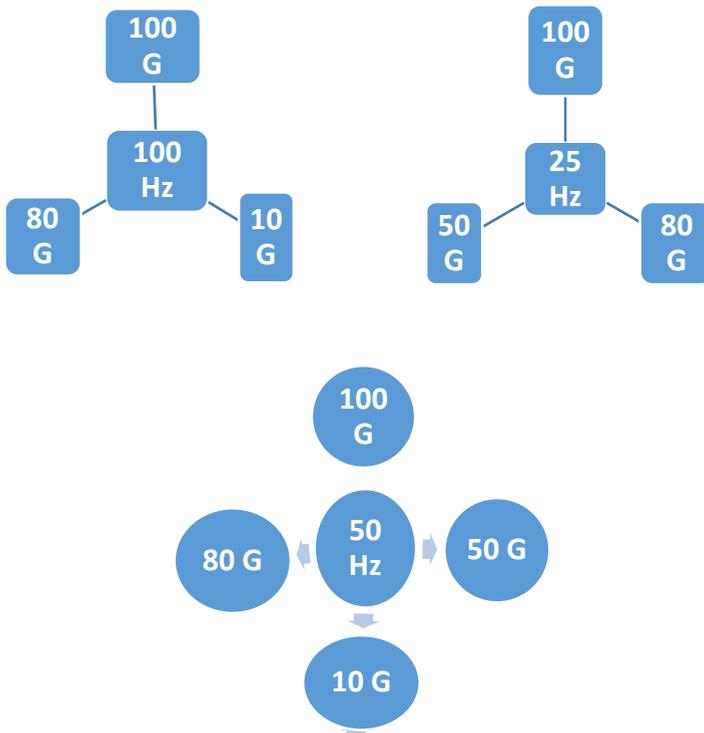


Figura 21: Frecuencias e intensidades de los CMs aplicados

2.2.- Tratamiento de las células con RI

Para el tratamiento con RI se ha utilizado el irradiador experimental, Yxlon Smart Maxishot 200-E, (Copenhagen, Denmark), con un voltaje de 200 Kv e intensidad 4,5 mA. La dosis absorbida ha sido de 2 Gy (fracción de dosis frecuentemente utilizada diariamente en el tratamiento con radioterapia). [Askoxyllakis et al., 2011]

El tratamiento combinado se ha efectuado exponiendo las células a CM y trascurridas 4 horas se ha procedido a la irradiación de las mismas.

2.3.- Protocolos

2.3.1.-Citometría de flujo para ciclo celular

Los estudios de ciclo celular se han llevado a cabo aplicando todas las frecuencias e intensidades mostradas en la **figura 21**.

Para determinar la distribución de las células a lo largo del ciclo celular después de los respectivos tratamientos utilizados en este estudio, las líneas celulares tumorales se han cultivado en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM formado por una mezcla de sales enriquecidas con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular), suplementado con suero fetal bobino (SFB) 10% y se han mantenido en el incubador MCO-20AIC (37'5º y 5% CO₂) hasta la realización de cada uno de los experimentos.

Se ha analizado el porcentaje celular en las diferentes fases del ciclo (G1, S y G2/M) cada 4 horas, desde el punto 1,

correspondiente al grupo control ó 0 horas, hasta el punto 13 que corresponde con 48 horas, tras exposición a CMs de diferentes frecuencias e intensidades. Además, se ha estudiado la distribución en el ciclo celular tras una aplicación continuada de CMs (50 HZ/100 G) durante 4 días, 30 minutos cada día. En este caso las medidas se llevan a cabo 24 horas después del tratamiento con campos magnéticos. Finalmente, se ha observado el proporción celular, en cada una de las fases del ciclo, tras la administración combinada de CMs (50 Hz/100 G) con radiación ionizante (2 Gy).

Para ello tras tripsinizar las células con 2ml de tripsina/EDTA, se neutralizan con 4 ml de DMEM y se cuentan con una cámara de Neubauer utilizando el microscopio óptico previamente descrito.

Para el estudio de ciclo celular durante las primeras 20 horas se han sembrado 200.000 cel/ml en cada frasco T25, para las primeras 20 horas. Para los siguientes puntos (hasta 48 horas) la concentración celular empleada ha sido de 150.000 cel/ml, para evitar la confluencia de las células.

El contaje celular se ha realizado de forma manual utilizando una cámara de Neubauer. Se ha contabilizado el número total de células considerando los diferentes cuadrantes de esta cámara y determinando el número medio en cada uno de ellos (**figura 22**).

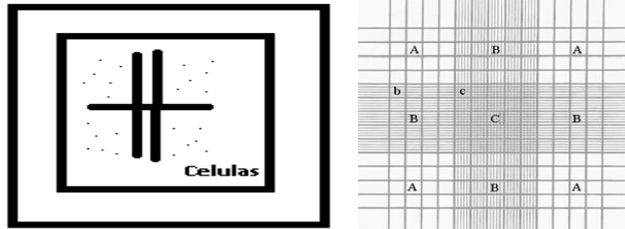


Figura 22. Cámara de Neubauer.

Una vez realizada la siembra celular, se incuban los cultivos durante 24 horas para que se adhieran y se comienzan a tratar a partir de las 24 horas de la siembra con las diferentes frecuencias e intensidades previamente detalladas (**figura 21**). Después de aplicar cada uno de los tratamientos durante un periodo de tiempo de 30 minutos, se analizan las paradas a lo largo del ciclo celular, cada 4 horas, y se llevan a cabo las medidas de citometría de flujo utilizando el siguiente protocolo.

Se recoge el sobrenadante utilizando una pipeta de 5 ml, en un tubo de falcon 15 ml. A continuación, se lava el frasco de cultivo con 1 ml de PBS (buffer fosfato salino compuesto por solución isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; no es tóxica para las células, y su pH es de 7.4) y se une el contenido al anterior en el tubo de falcon. Se introduce 1 ml de tripsiniza en el frasco y se coloca la caja de cultivo en el incubador para que el calor del mismo ayude a

despegar mejor las células, aproximadamente a los dos minutos, se extrae del incubador y aplicando ligeros golpes se provoca el que las células se despeguen. Inmediatamente después, para que la tripsina no altere a las células, se neutraliza ésta con 2 ml de DMEM. También se ha realizado la separación de las células con 1 ml de PBS y la rasqueta de forma mecánica, con este instrumento las “despegamos”, frotando por la superficie interna del frasco, evitando así tener que tratar las células con tripsina. Tras la obtención de la suspensión celular se recoge el contenido con una pipeta de 5 ml y se añade al tubo falcon de 15 ml. Se vuelve a lavar otra vez con 1 ml de PBS y se añade de la misma manera al tubo.

Se centrifugan los tubos, para obtener el “pellet” celular (concentración de células depositadas en el fondo del tubo), en la centrifuga a una velocidad de 1800-2000 rpm, durante 5 minutos a 4 grados de temperatura. Tras la centrifugación se elimina el sobrenadante.

Se lava con 1 ml de PBS, se resuspende varias veces para la disgregación de las células (con pipeta apropiada), se pasa la suspensión celular a tubos de citometría y se centrifuga (de la misma manera que la anterior vez) para eliminar el sobrenadante.

Finalmente, se fijan las células con 1 ml de etanol absoluto (70%)/PBS (30%) enfriado a 4°C que se echa gota a gota en cada tubo para asegurar una buena fijación y con ayuda del agitador para evitar la agrupación de las células, consiguiendo así que el citómetro pueda procesarlas correctamente. A continuación, se

guardan las células a 4°C (durante al menos 24 horas).

Tras la fijación celular, las muestras se centrifugan (como las anteriores veces) y se elimina el sobrenadante, se lava con 1 ml de PBS y se vuelve a centrifugar, a continuación se elimina el PBS. Seguidamente, se prepara una solución de yoduro de propidio (5 µg de IP, 1 ml de RNAsa y 0'5 ml de tampón citrato o PBS (fotosensible, no le puede dar la luz, y por ello los tubos con todas las muestras se tapan con papel de aluminio).

Se añaden 0'5 ml de esta disolución a cada muestra y, trascurridos 30 minutos, se procesan cada uno de los puntos experimentales en el citómetro.

Todos los experimentos se han realizado cuando la confluencia celular ha estado aproximadamente en torno al 80 %. Las células se han sembrado en frascos de cultivo T25 (25 cm²) considerando una confluencia aproximada de 60-70%. Todos los puntos se han medido por triplicado.

2.3.2.- Medidas de estrés oxidativo

Esta medidas se han llevado a cabo utilizando el Kit de detección de Enzo Life Sciences total ROS / superóxido que está diseñado para monitorizar en tiempo real directamente a las especies reactivas del oxígeno (ROS) en células vivas mediante microscopía de fluorescencia o citometría de flujo (**figura 23**). El kit incluye dos colorantes fluorescentes como componentes principales: reactivos de detección de especies reactivas de oxígeno totales (verde) y reactivo de detección de superóxido

(naranja). A través de la combinación de estas dos sondas fluorescentes específicas, el kit proporciona un ensayo simple y específico para la medición en tiempo real de los niveles globales de especies reactivas de oxígeno (ROS), y específicamente el superóxido en las células vivas.

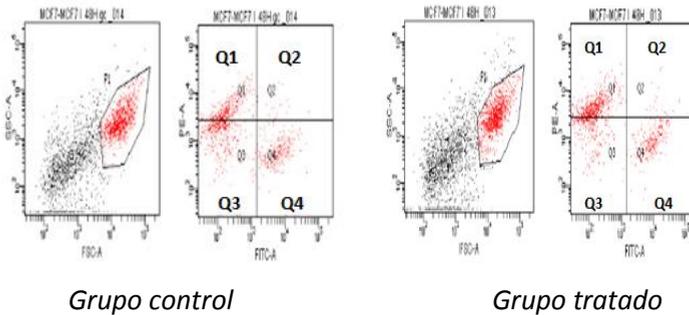


Figura 23: Representación gráfica de citometría de flujo para ROS. Medidas de radicales libres en la línea celular MCF-7, mostrándose las diferencias entre ROS (Q4) y superóxido (Q1) en grupo control y tras la aplicación de RI (2 Gy) a las 48h.

Las medidas de estrés oxidativo se han realizado después de la exposición de las células a CMs y tras el tratamiento combinado de CMs y RI. Se han aplicado campos magnéticos de 50 Hz de frecuencia y 100 G de intensidad (frecuencia e intensidad que se aplican en la clínica para el tratamiento de fracturas). La dosis de RI empleada ha sido de 2 Gy. En el caso de tratamiento combinado, la irradiación se efectúa 4 horas después de la exposición de las células a CMs.

Las especies reactivas de oxígeno se han cuantificado a las 24, 48 y 72 horas después de cada uno de los tratamientos efectuados. Para ello, se ha realizado la siembra celular en cajas de cultivo de T75 y se han efectuado las medidas de citometría de flujo considerando una confluencia del 50-60%, es importante considerar que el grado de confluencia influye en la respuesta a estrés oxidativo de las células. Se siembra un triplicado para cada punto, con su grupo control incluido, un grupo control para todo el experimento y un frasco para tratarlo con piocianina (compuesto químico que provoca daño celular, similar al de la aplicación del medio físico, y que se utiliza como control interno del experimento. A las 24 horas de finalizar todos los tratamientos se procesan todas las muestras por el citómetro de flujo siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Primero tratamos una muestra con la piocianina en cabina, para no contaminar el cultivo. Se aspira el medio, se lava 2-3 veces con 3 ml de PBS y se prepara 1 ml de tampón de lavado y 20 μ l de piocianina y se incuba durante 30 minutos a 37 °C.

El resto de frascos experimentales se procesan de igual manera fuera de cabina (no necesitan esterilidad), se aspira el medio, se lavan 2-3 veces con 3 ml de PBS y se aspira el medio, se vierte 1 ml de tampón de lavado y con la rasqueta, se despegan las células, se recogen con pipeta y se pasan a tubos de citometría.

Todas las muestras se centrifugan a 2000 rpm a 4°C durante 5 minutos, mientras tanto, preparamos los compuestos del preparado madre del que se añadirán 500 μ l y tras tinción en

obscuridad durante 30 minutos se procesan todas las muestras en el citómetro.

2.3.3.- Ensayos de supervivencia celular

La supervivencia celular se ha estimado mediante la realización de ensayos clonogénicos. Éstos nos permiten determinar si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia de más de 50 elementos tras haber sido expuesta a un tratamiento determinado, y, de esta manera, se elaboran las curvas de supervivencia celular o de dosis respuesta.

Se han obtenido curvas de supervivencia para el tratamiento exclusivo con RI tras aplicar dosis de 0 a 6 Gy y para el tratamiento combinado de RI con CMs de una frecuencia de 50 Hz y de intensidad de 100 G. Para ello, primero se ha efectuado la exposición de las células a CM y, trascurridas 4 horas, se ha llevado a cabo el tratamiento con RI.

Para la realización de las curvas dosis-respuesta se ha llevado a cabo la siembra celular utilizando diferente número de células en función de la dosis de radiación empleada. Así, para los grupos control y 2 Gy, se han sembrado 500 cel/ml (anteriormente se ha realizado la eficiencia de clonaje, para evaluar qué cantidad se debe sembrar, para evitar, que siendo un número insuficiente, no formen colonias, o habiendo exceso de células, se solapen las colonias y no se puedan contabilizar. Estimamos que un número óptimo de colonias es de aproximadamente 100 por cada frasco T25). A continuación, se siembra el doble de células por cada

punto superior, es decir, para 4 Gy se consideran 1000 cel/ml y para 6 Gy unas 2000 cel/ml.

El protocolo seguido para la realización de la siembra se resume en el siguiente ejemplo:

Tras tripsinización de las células se efectúa el conteo en la cámara de Neubaüer y se calcula la concentración celular mediante la ecuación:

$$V \times C = V' \times C'$$

De esta manera se obtiene una concentración madre (360.00 cel/ml) de la que partiremos para preparar el resto de puntos experimentales tras y como se muestra en el esquema siguiente **(figura 24)**.

Trascurridas 24 horas después de la siembra celular, se efectúa el tratamiento (RI y CMs y RI). Después de dos semanas se lleva a cabo el conteo de las colonias obtenidas. Para ello se elimina el medio de cultivo y se procede a la fijación y la tinción mediante la utilización de violeta de genciana (ICN Biomedicals, 101775) preparada al 2% en etanol absoluto. Las colonias formadas se contabilizan utilizando el microscopio óptico.

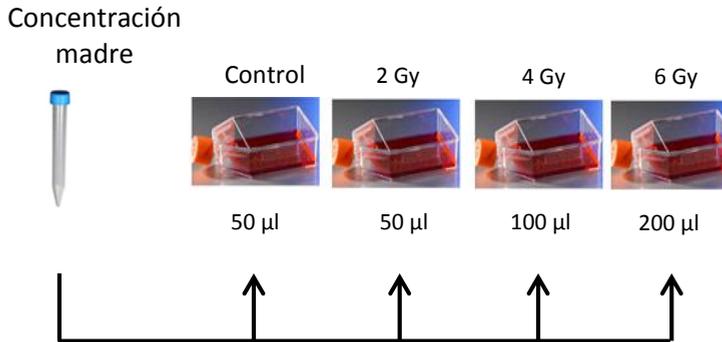


Figura 24. Puntos experimentales para el ensayo clonogénico

La fracción de supervivencia celular (FS) se calculó mediante la expresión:

$$FS = \frac{\text{Número de colonias observado}}{\text{Número de células sembrado} \times \text{eficiencia de clonaje}}$$

Los datos de supervivencia obtenidos se ajustaron al modelo lineal-cuadrático y de esta forma se han podido calcular los valores de fracción de supervivencia a 2 Gy (FS2) y los parámetros α y β de la curva de supervivencia celular como indicadores de la radiosensibilidad intrínseca.

La ecuación matemática para el ajuste de los datos experimentales al modelo lineal cuadrático (L-Q) es la siguiente:

$$FS = \exp [-(\alpha D + \beta D^2)]$$

RESULTADOS

I.- RESULTADOS

1.1.- Medidas de citometría de flujo

1.1.1.-Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día). Línea celular MCF-7

En la tabla 3, se representan los valores medios y la desviación estándar de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular a lo largo del tiempo. Estos valores han sido obtenidos tras el tratamiento con CMs de 100 Hz de frecuencia y 100 G de intensidad.

Tabla 3: Distribución de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (100 Hz/100 G)

Fases Ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	50,37	1,22	13,00	2,35	32,53	0,91
4	50,87	2,63	13,20	1,82	33,83	1,22
8	58,23	1,04	13,27	1,75	21,50	1,31
12	50,50	6,24	12,33	2,55	24,60	0,17
16	51,53	2,66	11,57	1,22	31,27	1,83
20	49,17	2,25	11,27	1,88	33,77	6,12
24	54,83	5,58	11,00	0,10	26,13	1,08
28	61,23	2,97	7,87	0,98	27,03	0,84
32	68,57	5,49	7,03	0,51	22,20	6,01
36	66,07	1,53	7,47	0,91	23,93	0,49
40	65,03	3,01	6,53	1,11	24,23	3,05
44	62,87	2,06	7,80	2,91	26,13	3,61
48	66,57	2,94	6,90	1,28	24,80	2,92

En la figura 25 se representan los valores medios del porcentaje de células obtenidos en los diferentes tiempos, en las distintas fases del ciclo celular, tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 100 Hz y 100 G de intensidad.

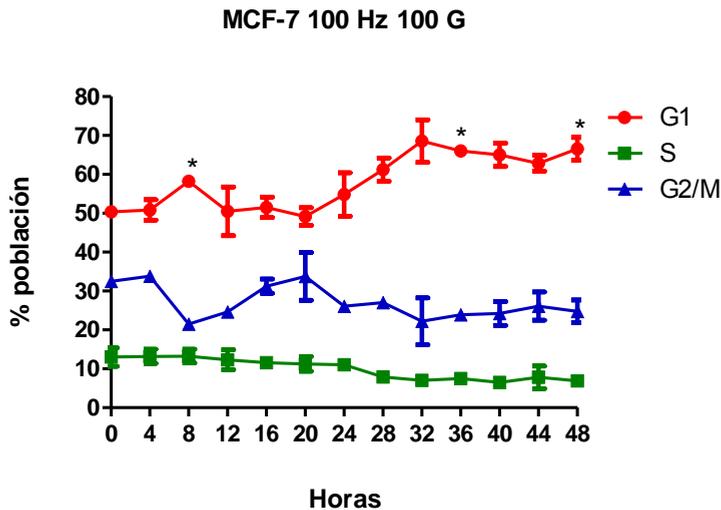


FIGURA 25. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 100 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.* P<0,05 vs CONTROL.

Se observa que la aplicación de los CMs, en esta línea celular, causa un aumento del porcentaje de células en G1 a las 8 horas. Esta parada se hace más acusada a partir de las 32 horas alcanzando valores significativos a las 36 y a las 48 horas. En las fases S y G₂/M no se observan cambios significativos para los diferentes tiempos analizados.

La tabla 4 muestra los valores medios y la desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo. Estos valores se han obtenido al aplicar, CMs con una frecuencia de 100 Hz y 80 G de intensidad.

Tabla 4: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (100 Hz/80 G)

Fases Ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	57,77	4,84	12,53	1,95	22,53	1,86
4	58,07	2,82	10,90	0,61	22,90	1,61
8	55,63	3,46	14,33	2,44	21,70	1,30
12	63,13	3,89	8,87	2,02	21,47	0,40
16	52,97	3,15	12,90	1,10	20,20	0,83
20	58,30	5,48	12,83	2,40	20,87	2,50
24	57,27	1,59	14,30	2,59	20,80	1,45
28	59,73	4,48	13,23	1,80	17,00	1,95
32	62,43	4,64	10,95	1,95	16,00	0,75
36	65,60	1,13	7,20	0,72	15,33	0,16
40	64,73	5,28	6,97	0,67	19,30	3,25
44	63,63	4,45	5,17	2,37	19,67	0,71
48	63,47	6,56	9,43	4,44	16,33	2,40

En la figura 26, se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular a distintos tiempos, tras ser tratadas con CMs de una frecuencia de 100 Hz y 80 G de intensidad.

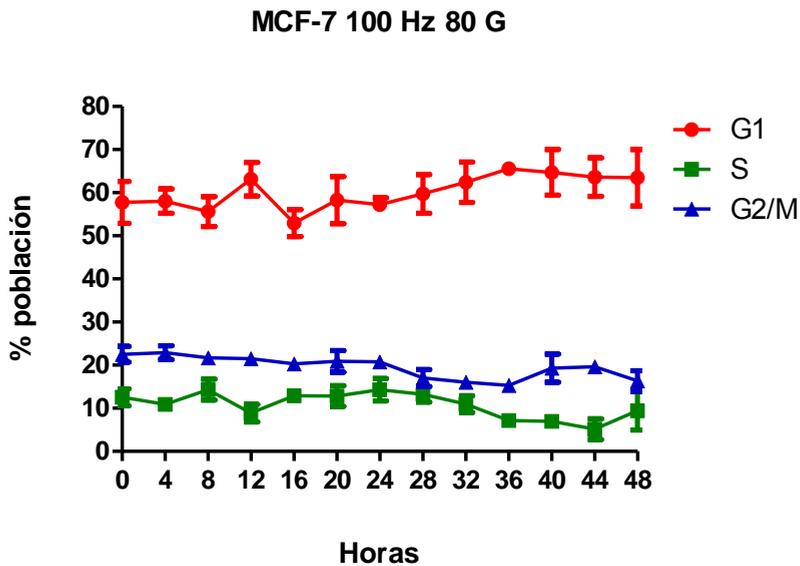


FIGURA 26. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 100 Hz 80 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.

En la Figura 26, se puede observar como esta línea celular, no muestra modificaciones en la distribución de las células en las distintas fases del ciclo, no originando el tratamiento con los CMs paradas en ninguna de las fases del ciclo.

La tabla 5 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, tras el tratamiento de las células con una frecuencia de 100 Hz y 10 G de intensidad.

Tabla 5: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (100 Hz/10 G).

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	53,80	3,96	7,60	2,26	34,90	0,85
4	65,20	2,12	5,45	0,21	28,60	3,11
8	57,75	0,35	6,70	0,71	32,90	0,14
12	55,00	0,14	8,90	0,42	32,85	0,64
16	59,25	3,18	6,90	0,57	29,70	1,98
20	59,70	0,14	6,40	0,14	30,40	0,71
24	54,50	0,99	7,40	0,14	31,85	1,48
28	61,75	2,05	6,45	0,35	28,50	2,40
32	61,70	2,12	5,85	1,63	29,05	1,20
36	61,10	0,99	7,05	0,92	29,90	0,42
40	61,25	0,78	5,50	0,14	31,20	0,57
44	73,40	1,41	4,90	0,71	20,10	1,27
48	59,25	3,75	5,70	0,42	31,45	2,05

En la Figura 27, se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular obtenidos para diferentes tiempos, tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 100 Hz y 10 G de intensidad.

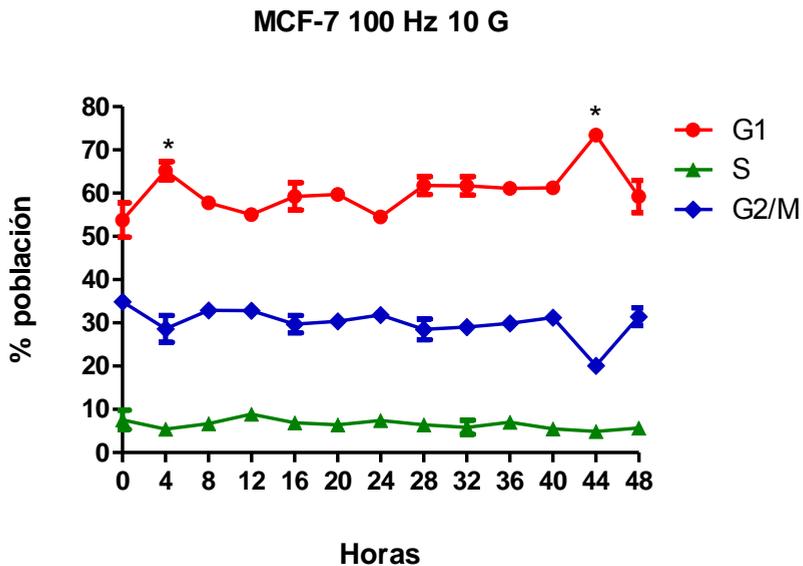


FIGURA 27. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 100 Hz 10 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado.* P<0,05 vs CONTROL.

En la Figura 27 podemos observar como el tratamiento de las células con CMs, origina la parada de éstas en la fase G1, alcanzando la significación estadística a las 4 y a las 44 horas. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 6 muestra los valores de la media y desviación estándar de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, tras ser tratadas con CMs con una frecuencia de 50 Hz y 100 G de intensidad.

Tabla 6: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/100 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	39,15	0,78	6,85	0,07	18,65	2,19
4	44,30	1,98	6,27	0,40	18,33	0,50
8	38,60	1,20	6,03	0,50	17,40	1,32
12	38,87	0,07	4,83	1,10	21,67	0,29
16	36,80	1,84	5,73	0,71	18,77	0,42
20	37,40	1,70	5,13	0,71	18,87	2,05
24	38,83	0,49	5,57	1,42	17,17	2,83
28	39,17	2,12	5,40	0,46	18,10	1,81
32	36,23	1,48	4,13	0,21	18,30	1,56
36	33,40	1,56	4,33	0,32	19,87	0,81
40	36,77	1,84	4,10	0,36	16,60	0,26
44	36,77	1,84	4,10	0,36	16,60	0,26
48	35,10	1,70	4,70	1,35	17,23	2,39

En la Figura 28 se representan los valores medios obtenidos para los diferentes tiempos, del porcentaje de células obtenidos en las diferentes fases del ciclo celular en la línea celular MCF-7 tras ser tratadas con una frecuencia de 50 Hz y 100 G de intensidad.

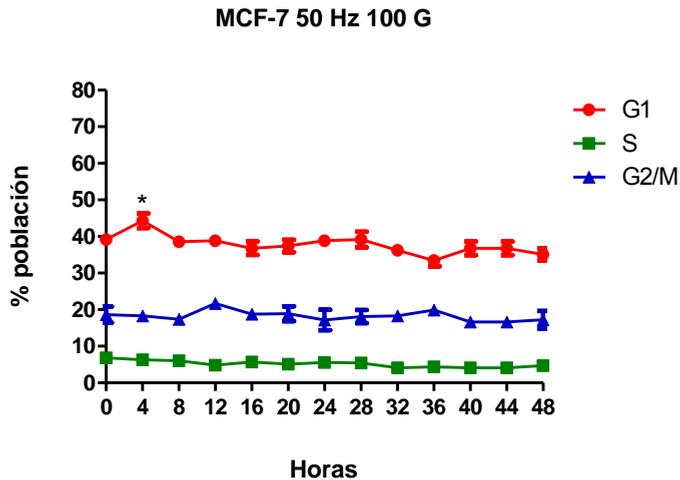


FIGURA 28. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL.

En la Figura 28, podemos observar, como al aplicar CMs con una frecuencia de 50 Hz y una intensidad de 100 G, se produce un incremento significativo de la proporción de células en la fase G1 a las 4 horas. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 7 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, tras el tratamiento de las células con CMs una frecuencia de 50 Hz y 80 G de intensidad.

Tabla 7: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/80 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	52,53	5,00	12,63	2,94	25,23	1,21
4	58,03	0,55	13,70	0,72	19,50	1,04
8	58,67	3,56	11,90	0,78	20,37	1,80
12	65,00	4,67	15,97	7,65	19,50	2,39
16	56,40	2,08	9,70	1,64	24,43	1,50
20	56,40	5,27	13,20	2,62	20,27	1,26
24	56,17	1,88	11,87	2,21	28,77	1,80
28	57,23	2,21	11,93	4,05	27,20	2,01
32	57,00	1,83	12,90	0,26	23,67	1,12
36	55,87	5,60	14,10	3,48	25,60	4,00
40	64,40	3,75	10,10	5,31	24,63	1,29
44	64,73	4,23	8,27	0,99	23,97	2,90
48	68,90	3,22	7,40	2,65	19,80	3,32

En la Figura 29 se representan los valores medios obtenidos para los diferentes tiempos, del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular tras el tratamiento de las células con CMs una frecuencia de 50 Hz y 80 G de intensidad.

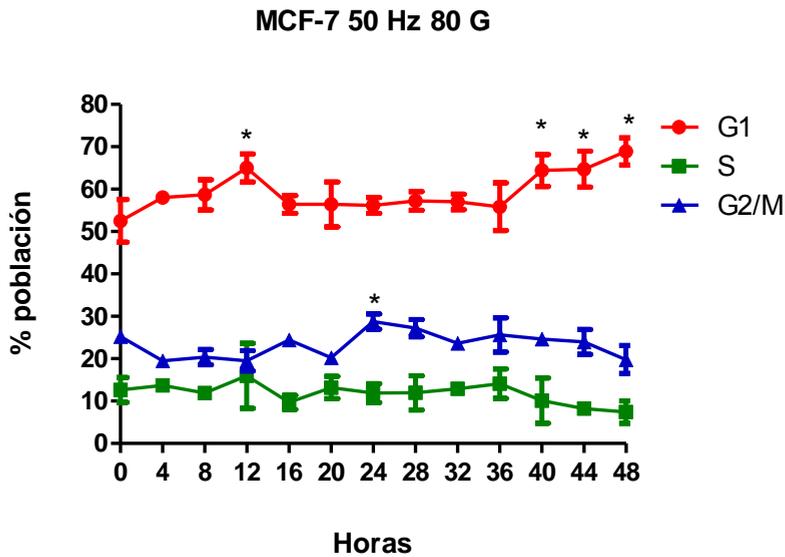


FIGURA 29. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 80 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

En la figura 29, podemos observar un incremento significativo, del porcentaje de células que se paran en la fase G1, a las 12, 40, 44 y 48 horas. No se observan cambios significativos a lo largo del tiempo en la fase S. En la fase G₂/M, se observa un incremento significativo a las 24 horas.

La tabla 8 muestra los valores medios y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, en células tratadas con CMs de una frecuencia de 50 Hz y 50 G de intensidad.

Tabla 8: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/50 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	56,70	1,27	11,10	1,98	29,25	0,35
4	61,05	0,78	14,20	0,99	21,70	0,99
8	60,35	0,21	14,50	0,57	26,60	0,57
12	57,60	0,99	13,45	0,78	27,80	1,27
16	60,85	1,48	12,05	1,63	22,05	1,34
20	60,50	0,42	14,45	0,78	23,45	0,92
24	63,35	2,76	11,10	1,27	23,90	0,28
28	60,40	2,83	11,15	6,29	23,35	4,03
32	57,85	1,63	14,00	0,14	22,05	0,07
36	56	1,41	12,50	0,71	23,25	0,35
40	57,25	0,07	13,95	1,48	25,50	1,20
44	59	1,41	13,75	1,06	24,75	1,06
48	58,80	2,83	14,60	3,11	24,85	1,48

En la Figura 30 se representan los valores obtenidos para los diferentes tiempos, del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, tras ser tratadas con CMs de una frecuencia de 50 Hz y 50 G de intensidad.

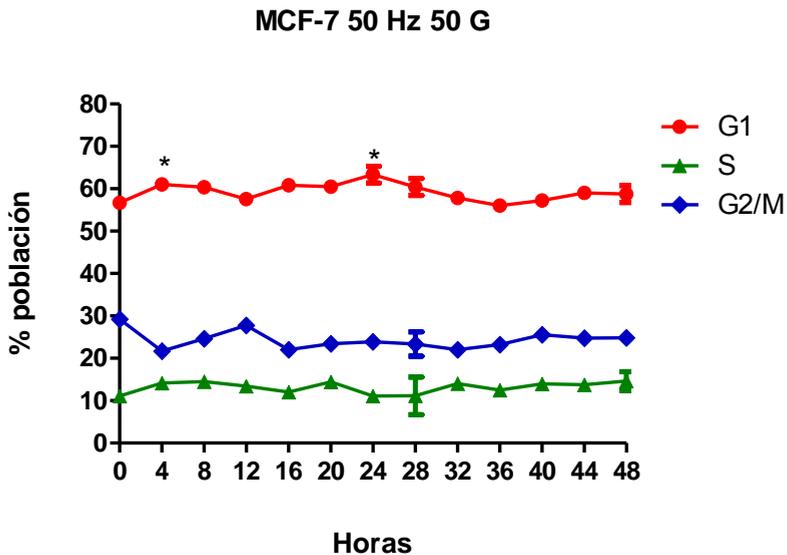


FIGURA 30. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 50 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

La figura 30, refleja un aumento significativo del porcentaje de población celular, en la fase G1 a las 4 y 24 horas. En las fases S y G₂/M no se observan cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 9 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 50 Hz y 10 G de intensidad.

Tabla 9: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/10 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	58,10	0,99	7,55	0,07	31,75	1,34
4	56,35	0,64	8,45	0,78	31,60	0,57
8	58,25	0,78	8,85	0,07	30,75	0,49
12	58,30	1,13	7,30	1,13	32,75	1,06
16	59,70	0,99	8,15	0,78	30,30	0,85
20	64,10	0,42	6,90	1,27	26,75	0,49
24	62,50	1,13	7,50	0,42	27,60	1,13
28	60,85	0,49	7,45	0,92	29,55	0,07
32	62,65	0,90	8,15	0,92	28,30	0,99
36	63,40	0,57	8,55	0,21	25,75	0,49
40	65,75	0,49	6,55	0,78	26,15	0,21
44	64,30	0,85	7,20	0,71	27,20	0,14
48	65,85	1,48	5,70	0,99	27,05	2,90

En la Figura 31 se representan los valores medios del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular para diferentes tiempos, en células tratadas con CMs con una frecuencia de 50 Hz y 10 G de intensidad.

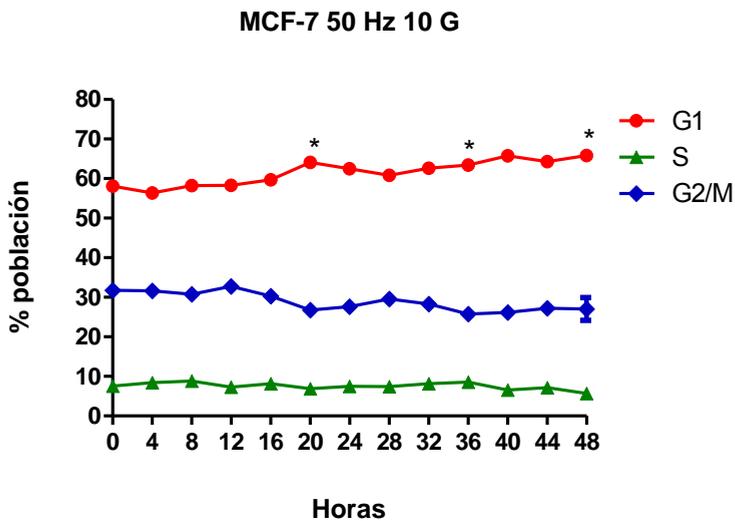


FIGURA 31. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 10 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.* $P < 0,05$ vs CONTROL.

Tras la aplicación de CMs (figura 31), observamos un incremento significativo del porcentaje de células en la fase G1 a las 20, 36 y 48 horas tras el tratamiento, para la línea celular MCF-7. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 10 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 25 Hz y 100 G de intensidad.

Tabla 10: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (25 Hz/100 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	56,17	2,56	10,17	1,62	29,10	3,99
4	53,97	3,46	10,43	0,42	32,13	1,82
8	49,07	0,79	12,60	0,85	31,05	1,96
12	49,60	7,11	12,93	0,47	27,67	6,85
16	56,83	4,86	8,13	2,18	28,03	4,79
20	60,27	1,56	13,07	0,91	18,73	2,23
24	58,20	2,40	10,73	1,50	21,70	1,75
28	63,20	1,42	8,40	1,80	19,03	1,19
32	64,17	1,04	7,83	1,04	19,33	1,53
36	63,60	4,20	7,77	2,70	19,27	2,66
40	57,47	1,65	9,40	1,16	18,67	2,35
44	60,43	5,69	9,10	1,95	20,57	1,67
48	56,53	0,55	8,90	0,36	19,17	0,76

En la Figura 32 se representan los valores obtenidos para diferentes tiempos, del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, en células tratadas con CMs de una frecuencia de 25 Hz y 100 G de intensidad.

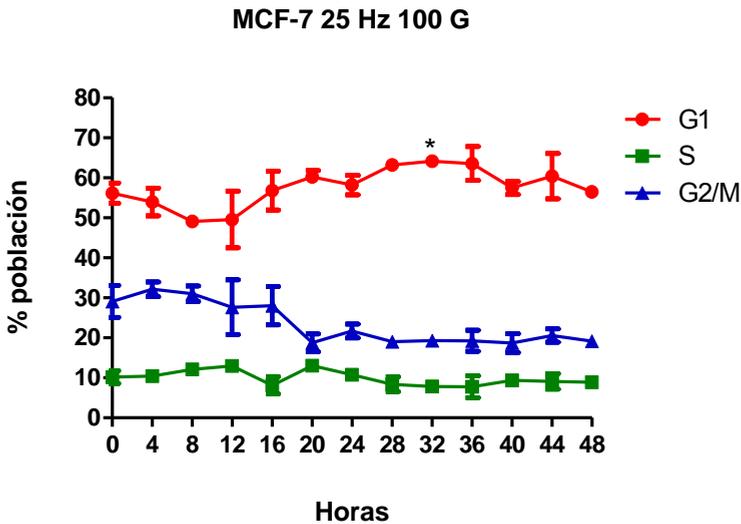


FIGURA 32. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 25 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL.

En la figura 32, se muestra una parada significativa de las células en la fase G1 del ciclo 32 horas tras el tratamiento con CMs. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 11 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, en células tratadas con CMs con una frecuencia de 25 Hz y 80 G de intensidad.

Tabla 11: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (25 Hz 80 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	59,63	1,00	12,40	1,59	23,23	0,23
4	58,47	7,18	12,60	1,25	23,57	2,84
8	56,90	0,96	12,53	1,20	22,83	1,90
12	59,17	3,10	10,37	1,77	22,90	2,71
16	58,5	1,50	10,3	1,53	22,83	1,4
20	64,87	6,40	13,77	2,50	16,77	3,12
24	60,37	4,01	14,67	3,57	20,10	2,77
28	57,43	5,83	13,67	1,50	18,77	2,97
32	58,23	6,20	10,17	4,24	23,80	5,63
36	52,60	5,93	16,03	1,55	20,70	2,08
40	60,47	4,19	8,23	2,39	23,03	0,92
44	64,43	2,21	7,17	1,76	20,40	2,21
48	64,13	2,58	10,90	0,93	21,30	0,87

En la Figura 33 se representan los valores obtenidos en los diferentes tiempos, del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 25 Hz y 80 G de intensidad.

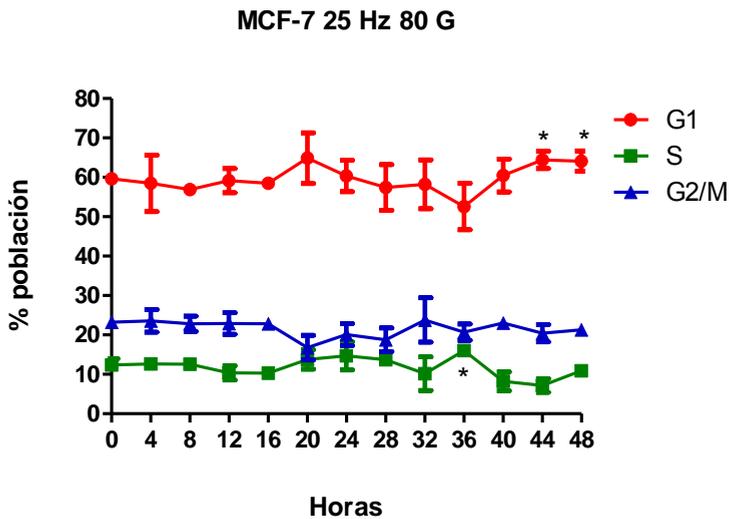


FIGURA 33. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 25 Hz 80 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. .* P<0,05 vs CONTROL.

Quando se aplican los CMs se aprecia un incremento significativo de la proporción de células en la fase G1 a las 44 y 48 horas tras el tratamiento. En la fase S se observa un incremento significativo de células a las 36 horas. En la fase G₂/M no se aprecian cambios significativos a lo largo del tiempo (figura 33).

La tabla 12 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, en células tratadas con CMs una frecuencia de 25 Hz y 50 G de intensidad.

Tabla 12: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (25 Hz/50 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	53,30	0,14	11,6	1,84	34,85	1,77
4	57,20	3,46	12,00	1,41	37,60	1,84
8	56,05	0,92	9,35	2,90	34,15	1,91
12	54,85	0,07	10,70	2,12	33,35	2,19
16	56,85	2,19	12,40	0,28	27,90	2,69
20	55,00	0,28	12,60	0,14	30,30	1,13
24	53,40	1,13	15,95	1,91	28,70	0,42
28	43,45	9,69	10,85	8,41	36,30	4,28
32	58,25	2,19	13,15	1,34	27,70	3,54
36	59,45	1,20	14,30	3,25	23,25	4,17
40	56,70	0,99	7,30	0,85	36,40	0,85
44	59,50	0,92	6,50	0,28	32,48	0,85
48	56,00	1,27	8,20	1,84	35,15	1,20

En la Figura 34 se representan los valores medios del porcentaje de células, obtenidos para diferentes tiempos en las distintas fases del ciclo en células tratadas con CMs de una frecuencia de 25 Hz y 50 G de intensidad.

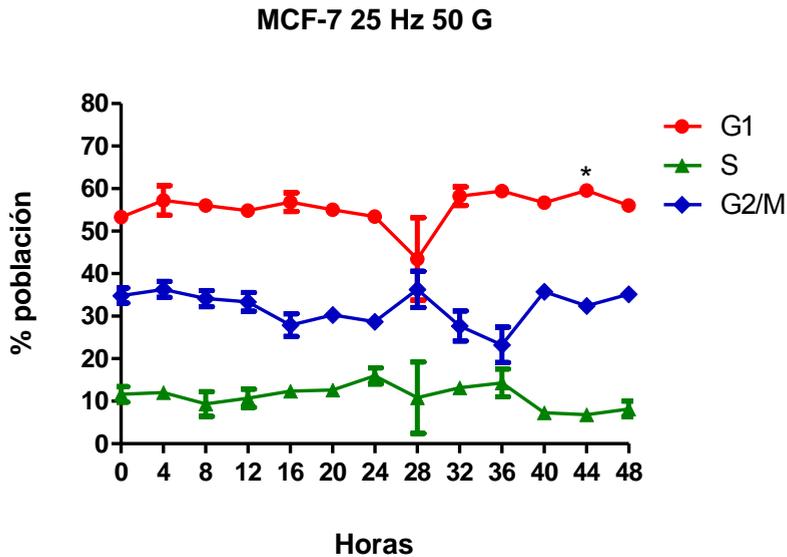


FIGURA 34. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 25 Hz 50 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. .* P<0,05 vs CONTROL.

En la figura 34, se observa un incremento significativo de la proporción de células en la fase G1 44 horas tras el tratamiento con CMs. En las fases S y G₂/M no se reflejan cambios significativos en la distribución de las células a lo largo del tiempo.

1.1.2.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/4 días). Línea celular MCF-7

La tabla 13 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células para las diferentes fases del ciclo celular, con las frecuencias e intensidades detalladas en la **figura 21**. En este caso las células han sido tratadas con CMs durante cuatro días y paradas a las 24 h de haber recibido el tratamiento.

Tabla 13: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs 4 días de tratamiento con diferentes valores de frecuencia e intensidad.

Fases ciclo	G1		G1 Gc	
f /I	Media	Desviación	Media	Desviación
25/50	58,13	1,59	62,30	1,56
25/80	57,47	3,62	59,50	3,04
25/100	64,23	0,71	60,87	4,51
50/50	63,30	2,25	62,77	1,46
50/80	65,20	3,13	61,63	5,95
Fases ciclo	S		S Gc	
f /I	Media	Desviación	Media	Desviación
25/50	12,53	2,18	11,13	1,46
25/80	12,53	0,97	11,87	0,60
25/100	10,23	0,42	12,07	3,97
50/50	11,10	1,47	11,20	0,40
50/80	10,40	0,70	11,30	0,50

Tabla 13: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs 4 días de tratamiento con diferentes valores de frecuencia e intensidad. Continuación.

Fases ciclo	G2/M		G2/M Gc	
<i>f / l</i>	Media	Desviación	Media	Desviación
25/50	25,60	0,46	22,97	1,54
25/80	22,23	1,85	23,60	2,34
25/100	22,40	1,70	23,53	0,75
50/50	20,33	2,01	21,07	2,90
50/80	20,90	1,66	21,33	0,32
Fases ciclo	G1		G1 Gc	
<i>f / l</i>	Media	Desviación	Media	Desviación
50/100	63,50	3,25	65,30	2,21
100/10	59,27	1,95	63,80	3,24
100/100	60,83	2,74	64,73	7,53
100/80	59,87	5,16	53,50	4,31
50/10	60,53	3,84	60,23	4,00
Fases ciclo	S		S Gc	
<i>f / l</i>	Media	Desviación	Media	Desviación
50/100	11,20	0,61	9,83	0,31
100/10	11,60	0,82	10,27	2,39
100/100	10,07	1,36	9,63	2,41
100/80	11,57	0,86	10,63	0,75
50/10	12,80	1,59	11,30	2,41

Tabla 13: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs 4 días de tratamiento con diferentes valores de frecuencia e intensidad. Continuación.

Fases ciclo	G2/M		G2/M Gc	
f / I	Media	Desviación	Media	Desviación
50/100	19,90	3,96	18,20	2,61
100/10	18,67	0,67	21,60	2,21
100/100	21,23	1,03	20,60	2,42
100/80	20,43	3,29	22,10	3,94
50/10	24,30	3,67	24,07	3,74

En la Figura 35 se representan los valores del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, en las células tras ser tratadas con las diferentes frecuencias e intensidades durante 4 días.

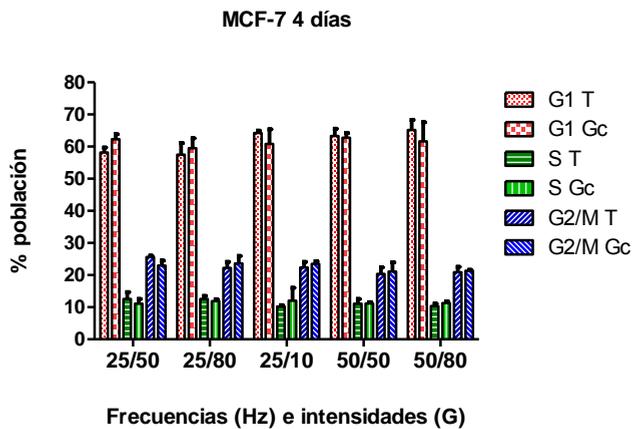


FIGURA 35. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs de diferentes frecuencias e intensidades. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células. En el eje de abscisas se observa las frecuencias e intensidades aplicadas. Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. Gc: controles. T: células tratadas

En la Figura 36 se representan los valores del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular, en las células tras ser tratadas con las diferentes frecuencias e intensidades durante 4 días.

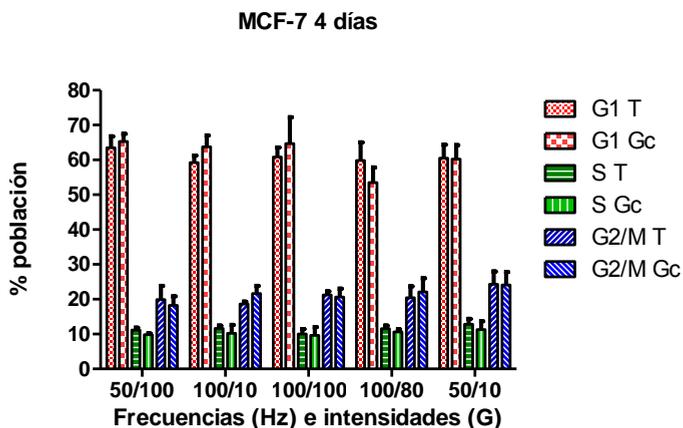


FIGURA 36. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs de diferentes frecuencias e intensidades. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células. En el eje de abscisas se observa las frecuencias e intensidades aplicadas. Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. Gc: controles. T: células tratadas.

Tras aplicar, durante 4 días, los tratamientos con diferentes frecuencias e intensidades no se observan cambios en la distribución de las células a lo largo del ciclo celular en ninguna de las fases (Figuras 35 y 36).

1.1.3.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día). Línea celular MDA-MB-231

La tabla 14 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de las células en las diferentes fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo, en células tratadas con CMs con una frecuencia de 100 Hz y 100 G de intensidad.

Tabla 14: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (100 Hz/100 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	51,15	1,91	13,75	1,63	32,90	3,68
4	56,70	3,54	10,15	4,03	33,05	1,48
8	62,90	1,13	5,45	1,20	29,45	2,19
12	57,90	2,69	6,45	0,07	32,40	1,41
16	67,75	1,06	5,30	0,42	24,65	0,35
20	63,95	0,64	7,90	0,28	27,10	0,42
24	65,85	0,64	5,95	0,35	25,15	0,21
28	63,50	1,41	5,90	0,42	27,50	1,41
32	61,35	3,18	8,20	3,11	28,70	0,28
36	61,00	6,36	7,20	2,12	29,45	3,89
40	66,40	0,99	7,45	0,49	24,45	1,06
44	68,30	0,57	6,35	2,47	23,30	1,70
48	66,60	1,70	10,15	2,19	20,85	3,32

En la Figura 37 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular para distintos tiempos tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 100 Hz y 100 G de intensidad.

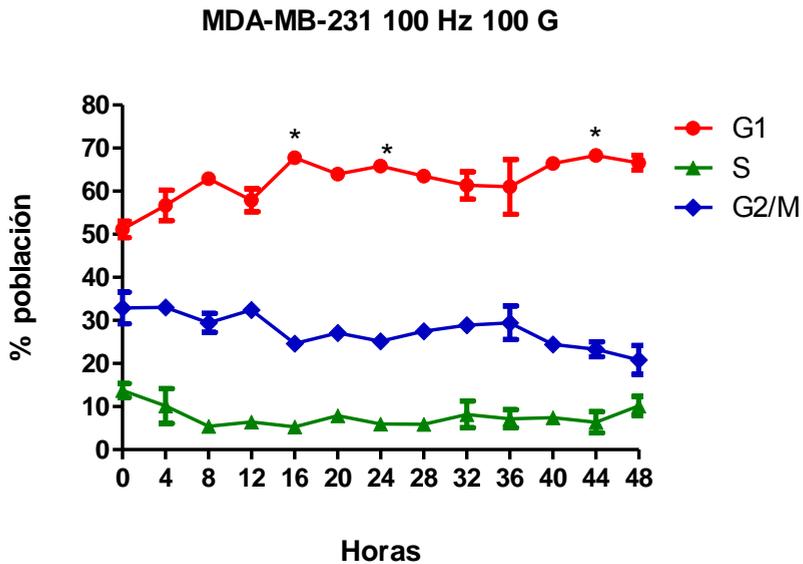


FIGURA 37. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 100 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

En la Figura 37, se muestra el aumento significativo de la población celular en fase G1 a las 16, 24 y 44 horas tras el tratamiento con CMs. En las fases S y G₂/M y no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 15 muestra los valores de la media y desviación estándar del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, a lo largo del tiempo tras el tratamiento de las células con CMs frecuencia de 100 Hz y 80 G de intensidad.

Tabla 15: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (100 Hz/80 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	57,75	0,78	6,85	4,31	30,15	0,92
4	52,20	4,95	9,45	6,72	34,10	1,98
8	56,10	0,99	7,05	0,49	31,60	0,28
12	56,65	2,62	9,05	0,49	32,15	2,05
16	55,75	1,06	10,65	0,49	30,10	1,27
20	58,90	0,71	12,10	0,14	28,20	0,99
24	60,65	0,78	12,30	1,13	26,15	0,35
28	60,05	0,21	9,90	0,14	28,35	1,63
32	58,90	3,96	8,55	1,91	30,30	2,97
36	59,25	1,77	7,10	1,27	27,57	3,49
40	66,75	0,35	6,90	0,28	24,10	0,42
44	68,55	0,49	9,35	0,78	20,20	0,28
48	68,50	3,68	7,50	0,57	21,10	2,26

En la Figura 38 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo para distintos tiempos tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 100 Hz y 80 G de intensidad.

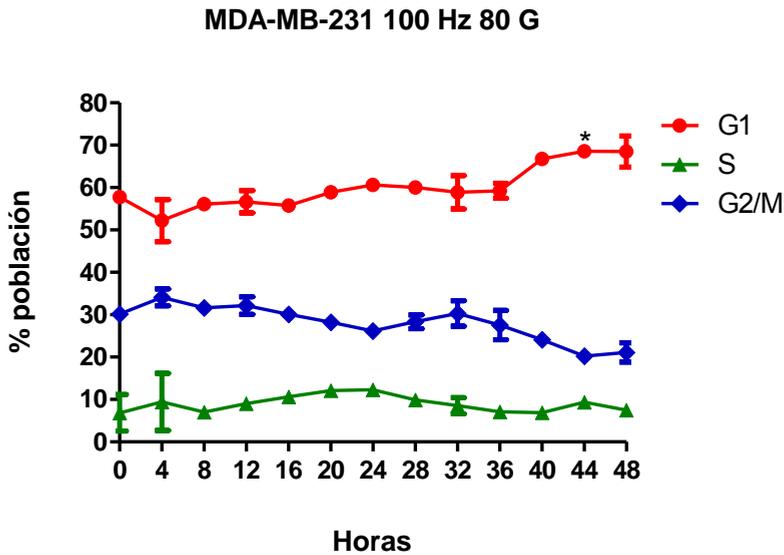


FIGURA 38. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 100 Hz 80 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

Según se muestra en la figura 38, se produce un incremento significativo de la proporción de células en la fase G1 del ciclo celular, 44 horas tras el tratamiento con CMs. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 16 muestra los datos relativos a la aplicación, del tratamiento de las células con CMs de frecuencia 100 Hz e intensidad de 10 G. Se muestran los valores medios y desviación estándar de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 16: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (100 Hz/10 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	51,40	2,12	11,65	1,06	36,20	2,83
4	44,75	1,48	14,60	0,71	39,90	0,85
8	50,20	3,11	11,60	3,68	37,20	0,14
12	53,80	2,83	10,60	0,42	34,70	2,12
16	58,30	0,57	11,00	0,28	30,55	0,21
20	58,70	1,13	9,80	0,57	30,25	2,33
24	59,90	3,11	9,75	0,92	29,10	2,12
28	53,20	4,10	8,85	0,07	36,95	3,89
32	62,40	6,36	8,20	0,42	29,15	6,15
36	63,50	0,14	7,70	0,14	28,50	0,57
40	64,10	0,42	7,45	0,78	28,35	1,20
44	69,65	0,78	10,80	0,42	19,05	2,19
48	64,95	5,16	14,75	2,33	20,50	3,25

En la Figura 39 se representan los valores medios del porcentaje de células obtenidos en las diferentes fases del ciclo celular para los distintos tiempos, en células tratadas con una CMs de frecuencia de 100 Hz y 10 G de intensidad.

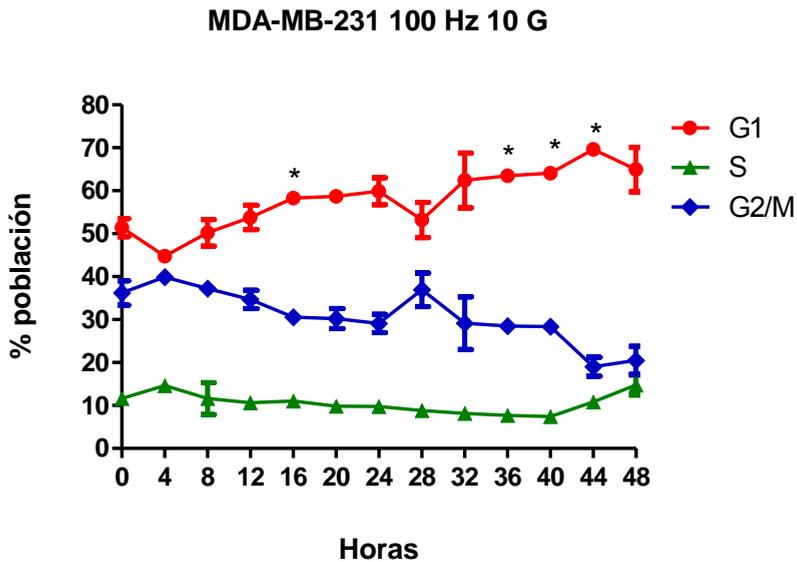


FIGURA 39. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 100 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.* P<0,05 vs CONTROL.

Al aplicar, tal y como se muestra en la figura 39, CMs a las células, se observa un aumento significativo de la proporción de células en la fase G1 a las 16, 36, 40 y 44 horas después del tratamiento. En las fases S y G2/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 17 muestra los datos relativos a la aplicación del tratamiento de las células con CMs, de frecuencia 50 Hz e intensidad de 100 G. Están descritas las medias y la desviación estándar de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 17: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/100 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Horas	Media	Desviación	Media	Desviación	Media
0	69,27	1,33	6,43	0,40	22,90	1,25
4	72,82	0,28	6,10	0,35	19,47	0,81
8	70,90	1,30	6,37	0,65	21,17	1,07
12	75,33	0,72	4,50	0,66	17,90	0,26
16	73,30	0,95	4,70	0,17	19,83	1,32
20	74,27	2,04	3,77	0,85	20,07	0,29
24	74,53	2,99	4,93	0,15	18,20	2,43
28	77,47	3,13	5,03	0,40	15,57	3,03
32	75,07	0,86	5,43	0,46	17,83	0,76
36	76,03	1,18	5,03	0,23	17,37	1,17
40	74,55	0,07	5,40	0,14	18,55	0,21
44	74,90	1,15	5,50	0,44	18,40	1,28
48	74,40	0,36	5,50	0,52	18,47	0,67

En la Figura 40 se representan los valores medios del porcentaje de células para las diferentes fases del ciclo celular, tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 50 Hz y 100 G de intensidad.

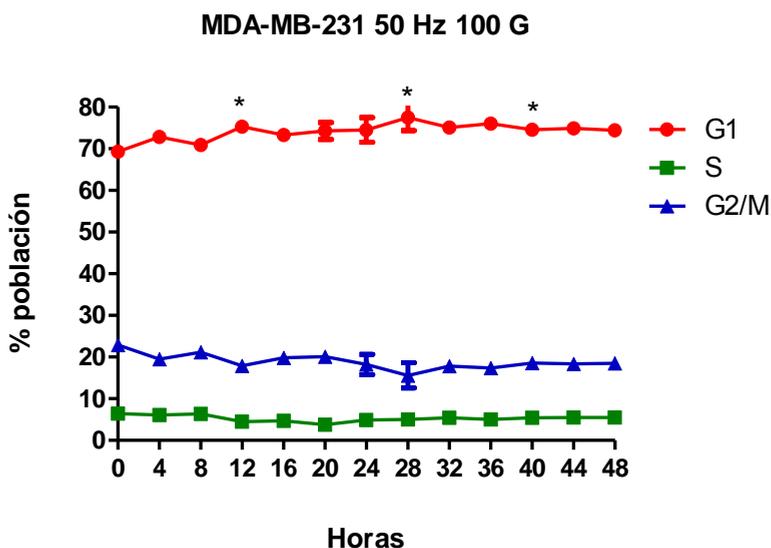


FIGURA 40. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. . * P<0,05 vs CONTROL.

En la Figura 40, se observa un incremento significativo de la proporción celular en la fase G1 del ciclo a las 12, 28 y 40 horas tras el tratamiento con CMs. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 18 muestra los datos relativos a la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo tras la aplicación de CMs, de frecuencia 50 Hz e intensidad de 80 G. Están descritas las medias y la desviación estándar de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 18: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/80 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	52,75	4,88	14,10	1,56	31,85	5,44
4	41,65	4,88	16,25	0,78	40,80	4,24
8	41,60	2,12	16,50	6,51	39,80	6,36
12	52,50	5,66	15,55	3,61	29,15	12,09
16	55,30	0,14	14,35	0,35	28,95	0,92
20	51,40	5,66	18,80	9,48	23,20	11,31
24	49,10	3,82	14,10	0,99	35,70	2,83
28	56,95	7,28	12,90	1,56	27,70	9,33
32	55,15	1,20	13,15	0,07	31,20	0,42
36	57,35	0,78	12,35	0,21	28,70	0,14
40	60,75	0,07	12,45	0,21	25,45	0,35
44	60,85	2,19	12,15	0,07	25,80	1,70
48	59,90	1,13	12,80	1,98	26,00	0,71

En la Figura 41 se representan los valores medios del porcentaje de células obtenidos para las distintas fases del ciclo celular obtenidos para diferentes tiempos en células tratadas con CMs de una frecuencia de 50 Hz y 80 G de intensidad.

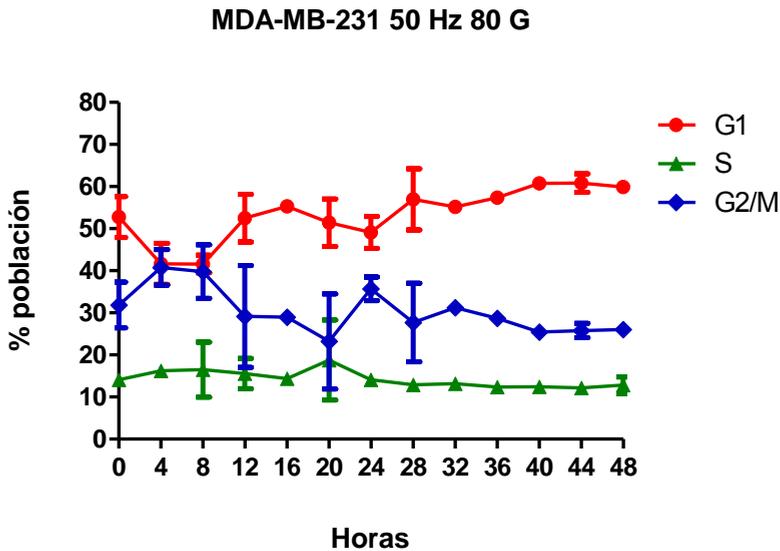


FIGURA 41. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 80 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.

La figura 40, refleja que no existen cambios significativos para los distintos tiempos analizados en las fases G1, S y G₂/M, tras el tratamiento de las células con CMs.

La tabla 20 muestra los datos relativos a la aplicación del tratamiento con CMs, de frecuencia 50 Hz e intensidad de 50 G, en la línea celular MDA-MB-231. Están descritas las medias y desviación estándar de los duplicados de las muestras tratadas

Tabla 19. Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/ 50 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	52,10	7,07	12,30	0,85	34,40	7,78
4	57,20	0,28	12,00	0,42	29,70	0,85
8	53,65	0,78	11,40	0,14	34,50	1,84
12	56,75	0,35	11,45	1,06	30,80	0,85
16	59,00	0,14	12,75	2,19	26,80	3,39
20	61,20	2,83	9,10	0,42	29,45	3,04
24	58,15	2,47	11,15	0,78	30,05	1,77
28	58,80	1,84	9,95	0,78	30,65	1,48
32	57,65	0,49	10	0,28	29,85	0,92
36	57,80	2,55	9,85	1,91	31,35	0,35
40	55,55	0,78	10,35	0,64	33,85	0,49
44	56,20	2,69	10,40	1,41	32,75	1,06
48	53,30	0,14	10,85	0,92	35,30	1,13

En la Figura 42 se representan los valores medios del porcentaje de células para las diferentes fases del ciclo celular para los diferentes tiempos tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 50 Hz y 50 G de intensidad.

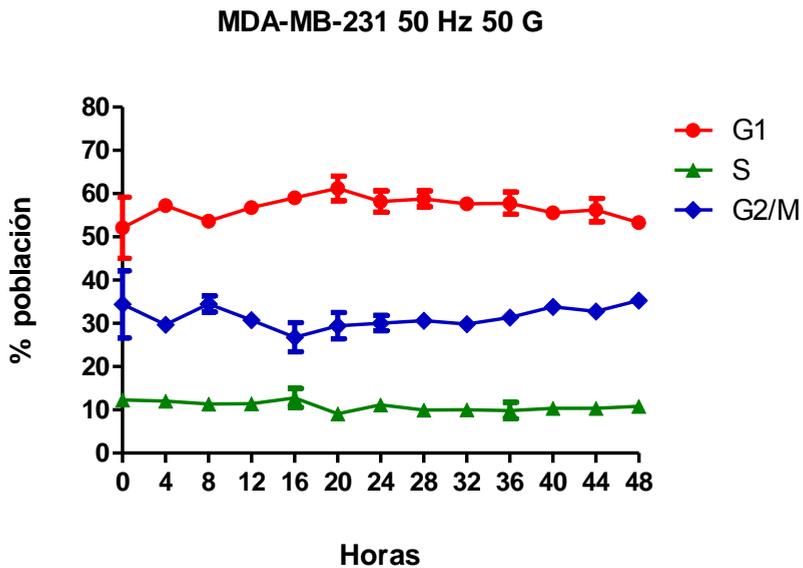


FIGURA 42. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 50 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.

En esta ocasión (figura 42), la línea celular MDA-MB-231 no muestra modificaciones en la distribución de las células a lo largo del tiempo en ninguna de las fases del ciclo celular

La tabla 20 muestra los datos relativos a la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo tras la aplicación del tratamiento con CMs de frecuencia 50 Hz e intensidad de 10 G. Están descritas las medias y desviación de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 20: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (50 Hz/10 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	52,75	4,88	14,10	1,56	31,85	5,44
4	56,75	2,62	10,35	0,21	31,65	2,47
8	57,75	1,48	11,50	0,42	29,35	0,49
12	37,60	1,84	17,35	1,06	43,95	2,90
16	49,40	7,50	15,10	1,84	34,55	4,03
20	48,80	0,00	15,10	0,57	35,35	1,20
24	48,95	3,18	16,05	1,77	34,05	4,31
28	48,20	1,84	14,95	1,48	36,25	0,35
32	46,20	0,99	12,25	2,19	41,50	0,14
36	57,10	0,28	9,90	0,99	31,85	0,07
40	57,15	0,07	12,45	2,47	29,10	1,84
44	62,45	5,44	18,85	2,05	18,40	2,40
48	71,10	1,70	9,15	1,77	19,50	0,42

En la Figura 43 se representan los valores del porcentaje de células obtenidos en las distintas fases del ciclo celular, obtenidos para distintos tiempos tras el tratamiento de las células con CMs, con una frecuencia de 50 Hz y 10 G de intensidad.

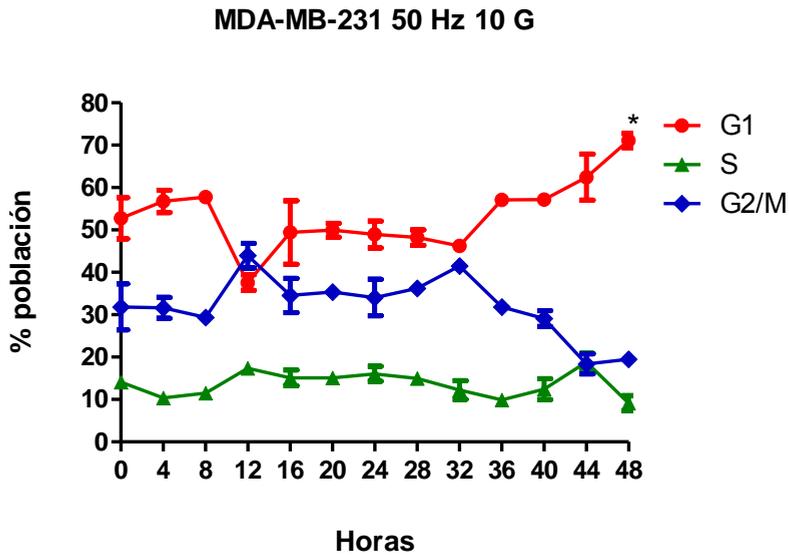


FIGURA 43. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 50 Hz 10 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.* P<0,05 vs CONTROL.

Se produce un aumento significativo del porcentaje de células en fase G1, tras la aplicación de CMs a las 48 horas tras el tratamiento. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 21 muestra los datos relativos al porcentaje de células en las distintas fases del ciclo después de la aplicación de este tratamiento. Están descritas las medias y desviación de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 21: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (25 Hz/100 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	47,30	1,56	12,25	1,06	39,60	2,69
4	52,30	2,83	12,15	0,49	35,70	1,98
8	59,10	2,55	9,80	0,42	30,15	2,90
12	54,65	2,05	9,60	0,99	35,05	1,20
16	48,95	2,47	11,70	1,41	39,10	4,10
20	49,55	3,04	11,90	1,13	35,10	2,40
24	50,25	5,02	10,65	0,49	38,15	4,17
28	52,95	0,35	9,85	2,05	36,60	2,40
32	47,35	0,49	12,45	0,49	39,80	0,14
36	50,05	1,48	10,80	0,99	38,80	0,42
40	50,70	1,84	10,05	1,48	38,25	0,21
44	50,05	0,35	10	0,35	37,5	0,64
48	51,95	0,21	10,80	0,07	37,3	0,85

En la Figura 44 se representan los valores medios del porcentaje de células obtenidos para las diferentes fases del ciclo celular para distintos tiempos tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 25 Hz y 100 G de intensidad.

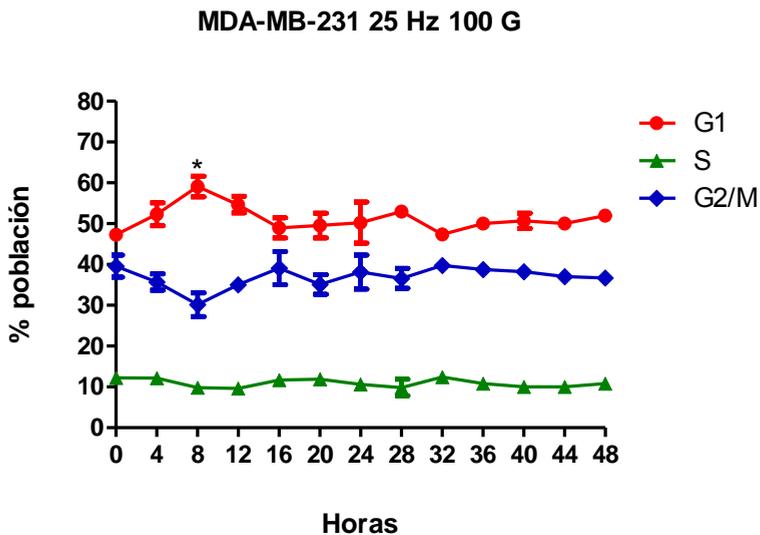


FIGURA 44. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 25 Hz 100 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

Tal y como se muestra en la figura 44, al aplicar CMs se produce un incremento significativo de la población celular a las 8 horas después del tratamiento en la fase G1. No se producen cambios, ni modificaciones significativas, en el resto de fases (S y G₂/M) del ciclo celular.

La tabla 22 muestra los datos relativos a la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular tras la aplicación de CMs de frecuencia 25 Hz e intensidad de 80 G. Están descritas las medias y la desviación estándar de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 22: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (25 Hz/80 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	55,00	1,13	19,10	1,70	24,10	0,14
4	54,75	2,90	18,60	1,13	23,25	0,78
8	53,80	0,42	15,60	0,85	28,95	0,92
12	52,50	1,90	15,30	0,14	32,65	0,35
16	59,80	1,70	15,25	0,21	23,95	2,62
20	59,70	0,85	15,30	0,57	23,20	0,14
24	59,35	0,21	15,05	0,07	24,15	0,07
28	58,55	2,05	15,25	0,21	25,45	1,06
32	60,90	0,00	14,70	0,14	23,90	0,14
36	63,60	2,83	14	0,57	20,35	2,90
40	62,80	0,42	12,90	0,14	21,70	0,71
44	64,45	0,92	11,85	0,35	22,50	0,49
48	62,85	1,34	13,60	0,71	21,20	0,28

En la Figura 45 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular obtenidos para los distintos tiempos tras el tratamiento de las células con CMs, de una frecuencia de 25 Hz y 80 G de intensidad.

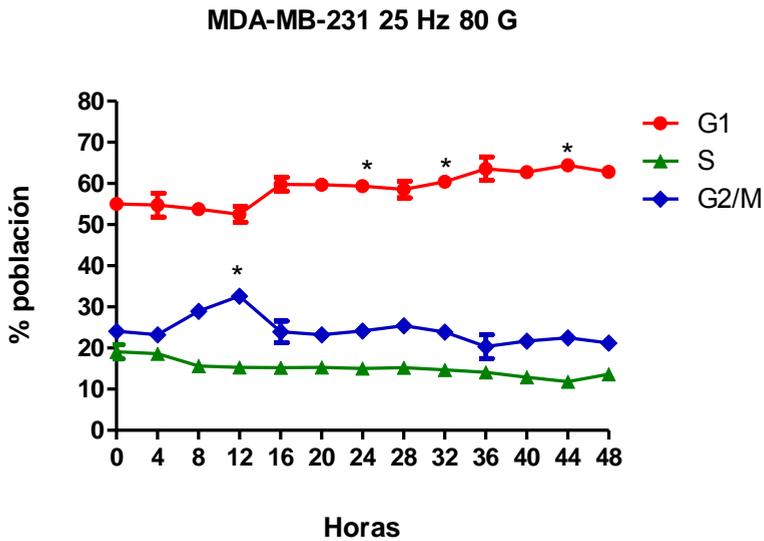


FIGURA 45. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 25 Hz 80 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.* P<0,05 vs CONTROL.

La figura 45 refleja un incremento significativo de la proporción de células en la fase G1 del ciclo a las 24, 32 y a las 44 horas y en la fase G2/M a las 12 horas, después del tratamiento con CMs. En la fase S no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

La tabla 23 muestra los datos relativos a la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo tras la aplicación de CMs de frecuencia 25 Hz e intensidad de 50 G. Están descritas las medias y la desviación estándar de los duplicados de las muestras tratadas.

Tabla 23: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs (25 Hz/50 G)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	52,40	1,70	12,65	0,07	33,25	2,62
4	48,80	1,27	13,20	1,56	37,10	0,28
8	55,45	0,35	10,40	0,28	32,50	0,07
12	57,95	0,64	9,80	0,71	32,10	1,41
16	53,70	1,41	14,05	0,07	32,10	1,56
20	55,75	0,07	13,20	1,41	30,30	1,98
24	54,60	1,84	12,25	0,35	32,35	2,33
28	55,65	0,92	12,45	0,78	31,65	0,07
32	57,30	1,41	12,50	0,42	28,70	0,85
36	63	0,28	12,20	0,57	22,60	1,84
40	63,30	1,84	11,40	0,71	24,45	0,35
44	65,15	0,49	10,45	1,20	24,15	0,64
48	61,60	0,42	11,00	0,14	26,25	0,49

En la Figura 46 se representan los valores del porcentaje de células obtenidos en las distintas fases del ciclo celular para diferentes tiempos tras el tratamiento de las células con CMs de una frecuencia de 25 Hz y 50 G de intensidad.

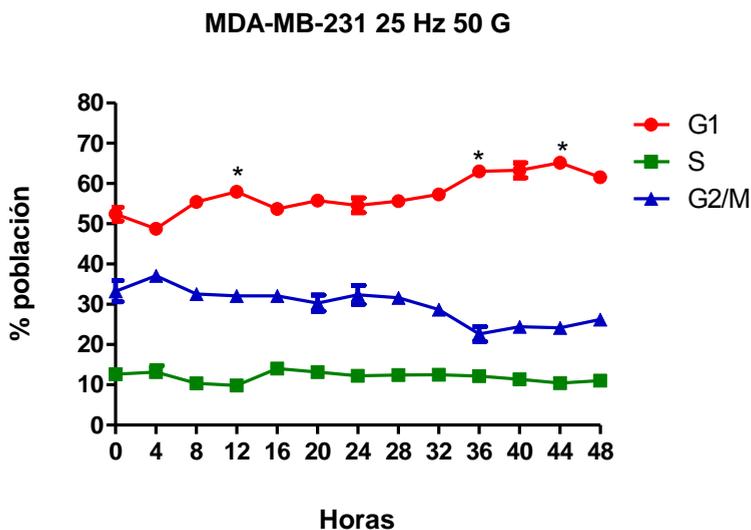


FIGURA 46. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs con 25 Hz 50 G. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado.* P<0,05 vs CONTROL.

Al aplicar CMs se observa un incremento significativo de la proporción de células en la fase G1 a las 12, 36 y 44 horas después del tratamiento. En las fases S y G₂/M no observamos cambios significativos a lo largo del tiempo.

1.1.4.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/4 días). Línea celular MDA-MB-231

La tabla 24, muestra los valores medios y la desviación estándar de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular 24 horas tras finalizar el tratamiento con CMs durante 4 días, para las diferentes frecuencias e intensidades detalladas en la figura 21.

Tabla 24: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs 4 días de tratamiento con diferentes valores de frecuencia e intensidad

Fases ciclo	G1		G1 Gc	
f / I	Media	Desviación	Media	Desviación
50/100	60,00	2,10	61,43	1,97
100/10	59,63	1,15	58,87	2,15
100/100	60,20	0,52	57,63	3,67
50/10	59,63	1,32	59,80	1,35
100/80	59,67	0,55	57,53	3,96
Fases ciclo	S		S Gc	
f / I	Media	Desviación	Media	Desviación
50/100	11,20	1,92	10,23	2,99
100/10	12,97	3,09	11,60	3,51
100/100	9,17	1,12	12,87	1,93
50/10	13,20	1,82	10,90	2,51
100/80	10,50	2,10	8,47	0,78

Tabla 24: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular. CMs 4 días de tratamiento con diferentes valores de frecuencia e intensidad. Continuación

Fases ciclo	G2/M		G2/M Gc	
f /l	Media	Desviación	Media	Desviación
50/100	28,63	1,02	28,50	1,57
100/10	27,37	4,19	29,23	3,15
100/100	30,33	0,96	28,57	1,63
50/10	26,63	2,34	28,77	1,25
100/80	30,37	1,46	33,30	2,54
Fases ciclo	G1		G1 Gc	
f /l	Media	Desviación	Media	Desviación
25/50	58,03	2,60	58,50	1,21
25/80	59,50	0,70	59,40	1,00
25/100	55,50	1,83	59,33	2,18
50/50	61,70	1,42	60,53	2,27
50/80	60,43	1,63	61,00	1,99
Fases ciclo	S		S Gc	
f /l	Media	Desviación	Media	Desviación
25/50	11,77	1,81	11,70	1,31
25/80	10,20	3,00	12,40	0,46
25/100	13,47	0,49	8,93	1,72
50/50	10,03	1,59	11,67	1,45
50/80	11,17	2,47	9,30	2,02
Fases ciclo	G2/M		G2/M Gc	
f /l	Media	Desviación	Media	Desviación
25/50	30,37	0,93	29,73	2,86
25/80	30,20	3,41	28,03	0,83
25/100	31,00	1,85	30,57	1,78
50/50	27,33	1,42	27,17	1,33
50/80	27,63	2,06	28,83	1,47

En la Figura 47 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento de las células con CMs de distintas frecuencias e intensidades durante 4 días.

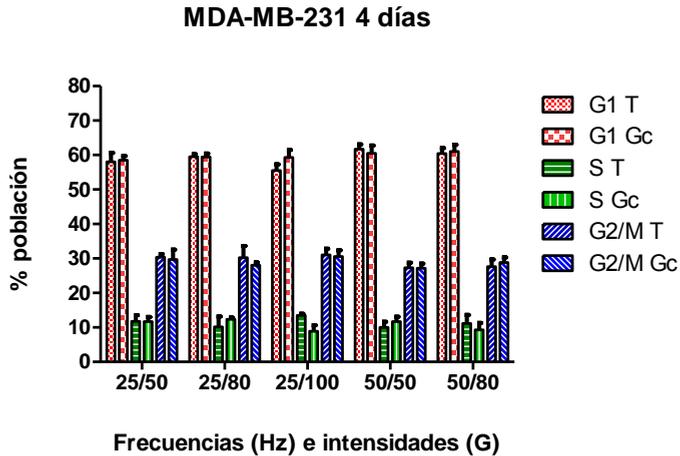


FIGURA 47. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs de diferentes frecuencias e intensidades. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células. En el eje de abscisas se observa las frecuencias e intensidades aplicadas. Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. Gc: controles. T: células tratadas

En la Figura 48 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento de las células con CMs de distintas frecuencias e intensidades durante 4 días. Las medidas se realizaron 24 horas después de finalizar el tratamiento.

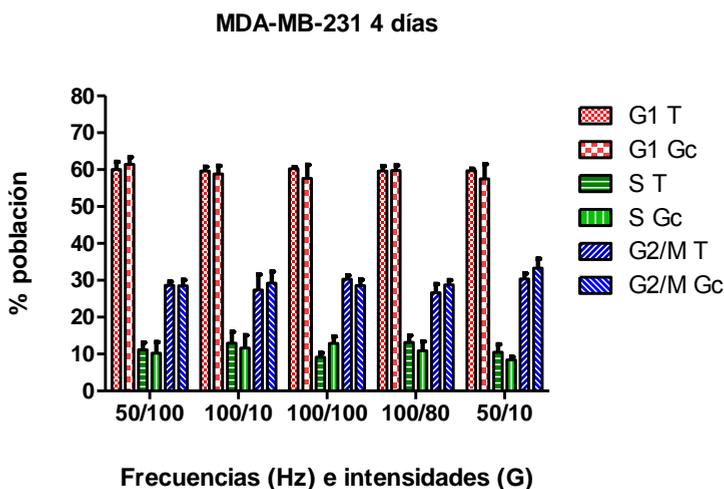


FIGURA 48. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con CMs de diferentes frecuencias e intensidades. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células. En el eje de abscisas se observa las frecuencias e intensidades aplicadas. Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. Gc: controles. T: células tratadas

No se observan cambios en la distribución de las células en las distintas fases del ciclo, tras aplicar, durante 4 días, las diferentes frecuencias e intensidades previamente descritas (Figuras 47 y 48).

1.1.5.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día) y/o radiación ionizante. Línea celular MCF-7

El objetivo de este trabajo de investigación, ha sido determinar si los CMs podrían radiosensibilizar las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Para ello, las células se sometieron durante 30 minutos a la acción de CMs (50 Hz/100 G), 4 horas antes del tratamiento con 2 Gy de radiación ionizante (RI).

La tabla 25 muestra los valores medios y la desviación estándar de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular, tras el tratamiento con RI.

Tabla 25. Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento con RI (2 Gy)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	45,90	3,68	12,80	0,85	41,10	4,24
4	40,20	0,28	12,95	2,47	47,00	2,97
8	46,45	0,35	9,95	0,07	43,65	0,92
12	43,25	2,33	6,45	3,18	50,10	1,13
16	60,85	0,35	11,50	0,85	27,05	0,35
20	62,35	4,60	11,90	1,70	25,20	5,52
24	61,20	0,57	14,25	0,64	23,40	0,85
28	59,35	1,91	15,95	2,76	24,30	3,96
32	48,55	2,19	9,60	0,71	41,25	2,33
36	58,85	4,17	11,25	2,19	29,70	6,36
40	55,70	1,98	10,30	0,57	33,75	1,48
44	49,70	3,39	11,65	0,35	38,30	3,54
48	48,80	1,56	11,10	0,71	40,00	2,26

En la Figura 49 se representan los valores medios del porcentaje de células para diferentes tiempos, tras el tratamiento con 2 Gy de RI.

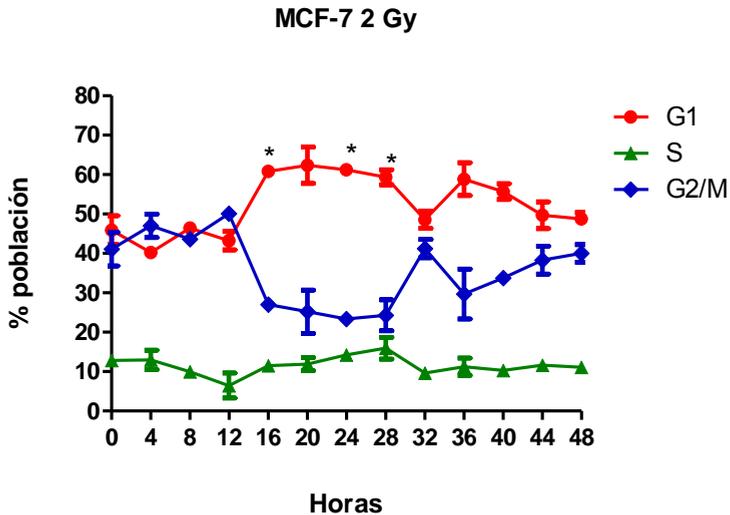


FIGURA 49. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con RI (2 Gy). En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL

El tratamiento con RI provoca una parada del ciclo en la fase G1, estadísticamente significativa, para las 16, 24 y 28 horas tras la irradiación celular. No se observan cambios significativos a lo largo del tiempo en las fases S y G₂/M.

En la tabla 26, se representan los valores medios y desviación estándar de la proporción de células, en las diferentes fases del ciclo celular a lo largo del tiempo tras el tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy).

Tabla 26: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy).

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	42,80	5,80	11,10	4,81	45,80	0,71
4	38,90	3,96	12,30	5,52	48,10	1,70
12	44,7	0,90	7,50	0,60	47,90	0,84
16	44,00	2,40	10,35	0,35	43,65	0,64
20	46,00	1,40	14,45	2,05	39,30	0,90
24	46,45	1,34	11,40	0,71	42,45	1,77
28	49,20	1,84	16,45	3,32	39,70	11,60
36	48,25	0,78	9,80	0,99	41,90	0,14
40	51,95	0,21	9,25	0,21	40	1,69
44	47,85	1,77	10,50	1,27	41,65	0,49
48	45,80	2,97	9,90	0,57	43,40	4,81

En la Figura 50 se representan los valores medios del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular, para diferentes tiempos, tras el tratamiento de las células con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2Gy).

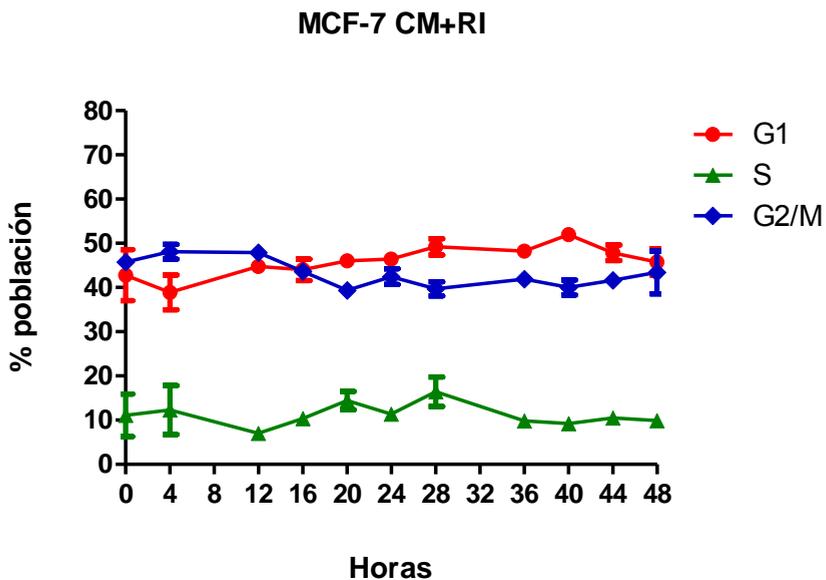


FIGURA 50. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular después del tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy). En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se pararon en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado.

Se observa que el tratamiento de las células con CMs y RI no origina alteraciones de las células en la distribución de éstas en ninguna fase del ciclo celular.

La comparativa (Figura 51) entre las gráficas de MCF-7 RI vs CMs y RI (Figuras 49 y 50) mostró una disminución de la población celular en fase G1 tras el tratamiento combinado respecto del tratamiento sólo con radiación ionizante. Tras aplicar una dosis de 2Gy de radiación ionizante, se obtuvo un incremento significativo de la población celular a las 24 horas en la fase G1. La representación conjunta del tratamiento CMs y RI en comparación con el uso exclusivo de RI puso de manifiesto que, la combinación de ambos tratamientos, origina una mayor proporción de las células en la fase G2/M del ciclo al comparar la distribución de células encontradas con el uso de RI; encontrándose paradas significativas a las 16 y 24 horas. No se aprecian modificaciones en la distribución de células en la fase S del ciclo para ninguno de los dos tratamientos empleados.

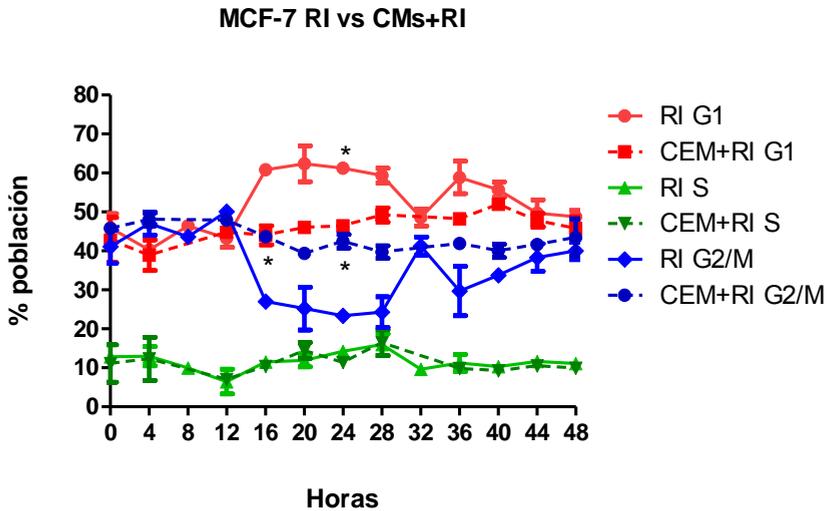


FIGURA 51. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular después del tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy) y tratamiento exclusivo con RI. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

1.1.6.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMS (30 minutos/1 día) y/o radiación ionizante. Línea celular MDA-MB-231

En el tratamiento combinado de CMS y RI, las células se sometieron durante 30 minutos a la acción de CMS (50 Hz/100 G) 4 horas antes del tratamiento con 2 Gy de radiación ionizante (RI).

En la tabla 27, se representan los valores medios y la desviación estándar de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular a lo largo del tiempo tras el tratamiento de las células con RI (2 Gy).

Tabla 27: Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento con RI (2 Gy).

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	55,20	0,07	15,6	1,40	32,60	1,34
4	51,25	1,91	17,55	0,49	31,40	1,98
8	45,40	1,13	6,30	0,14	47,75	0,64
12	41,50	0,85	11,85	0,78	46,05	0,78
16	46,40	4,53	11,30	0,71	42,15	5,30
20	51,60	0,71	11,05	3,04	36,95	1,34
24	48,40	1,27	12,50	1,41	39,00	0,14
28	51,00	2,97	13,40	0,28	35,50	2,83
32	48,95	1,77	12,50	1,13	37,50	3,54
36	54,10	1,56	9,05	0,35	37,25	2,19
40	56,40	0,85	8,75	0,64	33,80	0,14
44	52,70	3,68	11,70	0,14	35,60	3,82
48	54,55	2,90	10,20	1,84	35,20	4,81

En la Figura 52 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular para distintos tiempos tras el tratamiento de las células con 2 Gy de RI.

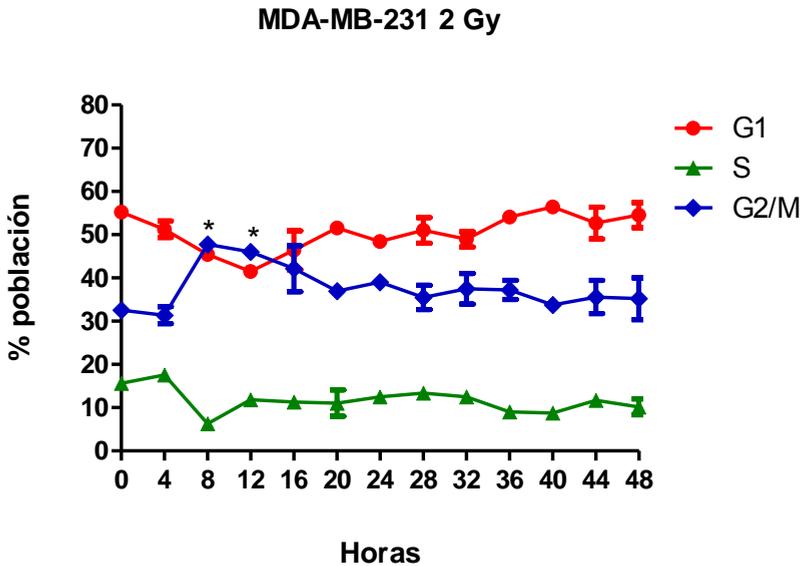


FIGURA 52. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras ser tratadas con RI (2 Gy). En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado.

Como se puede apreciar en la Figura 52, la aplicación de una dosis de 2 Gy de RI no provocó cambios en la distribución de las células en las fases G1 y S del ciclo celular a lo largo de los diferentes tiempos analizados. En la fase G₂/M se observa un incremento de células significativo a las 8 y 12 horas.

En la tabla 28, se representan los valores de medios y la desviación estándar de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular a lo largo del tiempo tras el tratamiento de las células, con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy).

Tabla 28. Porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy)

Fases ciclo	G1		S		G2/M	
	Media	Desviación	Media	Desviación	Media	Desviación
0	45,45	1,06	11,90	0,28	42,55	0,78
4	37,70	2,69	12,75	0,21	48,95	1,91
12	49,15	0,35	8,05	2,05	41,20	0,14
16	48,85	1,06	9,55	1,63	39,45	3,32
20	55,55	1,20	11,35	0,35	32,50	1,56
24	46,80	4,38	15,80	4,67	36,75	0,35
28	46,15	0,49	11,90	6,65	42,05	6,86
36	70,45	0,49	8,75	1,63	20,85	2,05
40	54,30	0,57	10,40	0,28	34,35	0,49
44	53,95	0,35	12,15	1,91	31,85	3,32
48	54,40	1,41	9,40	0,85	36,50	1,98

En la Figura 53 se representan los valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular para distintos tiempos tras el tratamiento con CMs y RI.

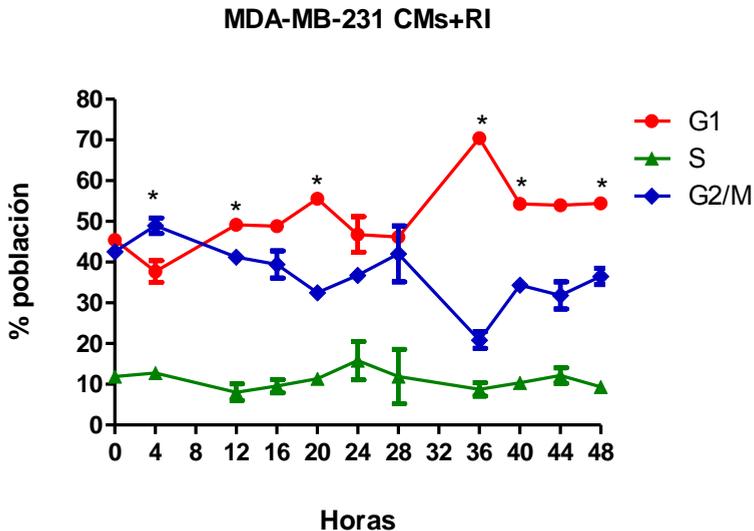


FIGURA 53. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular después del tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy). En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. * P<0,05 vs CONTROL.

Como se puede observar en las células muestran una parada estadísticamente significativa en la fase G1 del ciclo a las 12, 20, 36, 40 y 48 horas, después del tratamiento combinado. La fase S no muestra cambios significativos. En la fase G₂/M se observa un incremento de células significativo a las 4 horas.

La representación conjunta del tratamiento RI vs CMs y RI (figura 54) en comparación con el uso exclusivo de RI puso de manifiesto que, la combinación de ambos tratamientos, origina una mayor proporción, significativa, de las células que paran en la fase G1 del ciclo 36 horas después del tratamiento. Tras la exposición de RI, encontramos un incremento significativo de células en la fase G1 a las 4 horas. No se aprecian modificaciones en la distribución de células en la fase S del ciclo para ninguno de los dos tratamientos empleados. En la fase G2/M encontramos un incremento significativo tras la aplicación del tratamiento combinado de CMs y RI, a las 4 horas y un incremento significativo de células que paran su ciclo tras la exposición de RI, a las 36 horas.

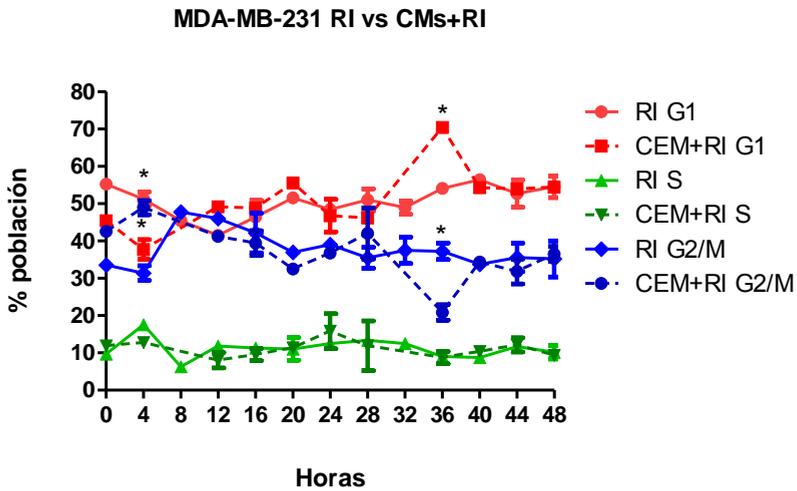


FIGURA 54. Valores medios del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular después del tratamiento con CEMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy) y tratamiento exclusivo con RI. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que se paran en G1, S y G₂/M. En el eje de abscisas se observa los diferentes tiempos (0-48h). Los valores representan la media ± DE de un experimento por triplicado. *P<0,05 vs CONTROL.

1.2.- Medidas de estrés oxidativo tras la aplicación de RI y el tratamiento combinado con CMs y RI

Se ha determinado el estado de estrés oxidativo originado por exposición a CMs y/o tratamiento con radiación en las dos líneas celulares objeto de estudio. Para ello, se realizaron medidas de radicales libres, concretamente, de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de anión superóxido.

Las tablas 29 y 30 muestran los datos correspondientes a la medida de radicales libres en la línea celular MCF-7, a las 24, 48 y 72 horas, tras el tratamiento con una dosis de 2 Gy de RI. También se recogen los datos correspondientes al tratamiento conjunto con CMs (50 Hz de frecuencia y 100 G de intensidad) y RI (2 Gy).

Tabla 29. Expresión de radicales libres en la línea celular MCF-7 tras el tratamiento con RI (2Gy)

MCF-7 RI	24 horas		48 horas		72 horas	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Radicales libres						
ROS	4,63	4,75	21,53	1,61	36,57	6,86
SUPERÓXIDO	23,50	9,20	49,93	5,65	28,77	7,29
ROS+SUPERÓXIDO	1,67	1,16	2,13	0,12	2,90	1,21

Tabla 30. Expresión de radicales libres en la línea celular MCF-7 tras el tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy)

MCF-7 CM+RI	24 horas		48 horas		72 horas	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
ROS	10,40	2,69	23,70	12,57	29,53	7,03
SUPERÓXIDO	22,20	0,35	48,70	8,13	33,37	12,36
ROS+SUPERÓXIDO	1,40	0,62	2,20	1,23	2,30	0,70

Las tablas 29 y 30 muestran los datos correspondientes a la medida de radicales libres en la línea celular MDA-MB-231 a las 24, 48 y 72 horas, tras el tratamiento con una dosis de 2 Gy de RI. También se recogen los datos correspondientes al tratamiento conjunto con CMs (50Hz de frecuencia y 100 G de intensidad) y RI (2 Gy).

Tabla 31. Expresión de radicales libres en la línea celular MDA-MB-231 tras el tratamiento con RI (2Gy)

MDA-MB-231 RI	24 horas		48 horas		72 horas	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
ROS	75,60	4,60	78,37	2,15	77,40	2,85
SUPERÓXIDO	14,10	4,69	12,77	1,76	15,97	3,27
ROS+SUPERÓXIDO	3,53	0,47	3,33	0,68	2,90	0,26

Tabla 32. Expresión de radicales libres en la línea celular MDA-MB-231 tras el tratamiento con CMs (50 Hz/100 G) y RI (2 Gy)

MDA-MB-231 CM+RI	24 horas		48 horas		72 horas	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
ROS	75,93	4,55	76,37	2,22	74,30	3,70
SUPERÓXIDO	13,63	4,97	14,17	2,40	17,77	3,66
ROS+SUPERÓXIDO	4,43	0,45	3,97	0,70	4,17	0,55

En la Figura 55 se representa el porcentaje de células que expresan ROS medidos a diferentes tiempos en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después del tratamiento exclusivo con radiación y el tratamiento combinado con CMs y radiación.

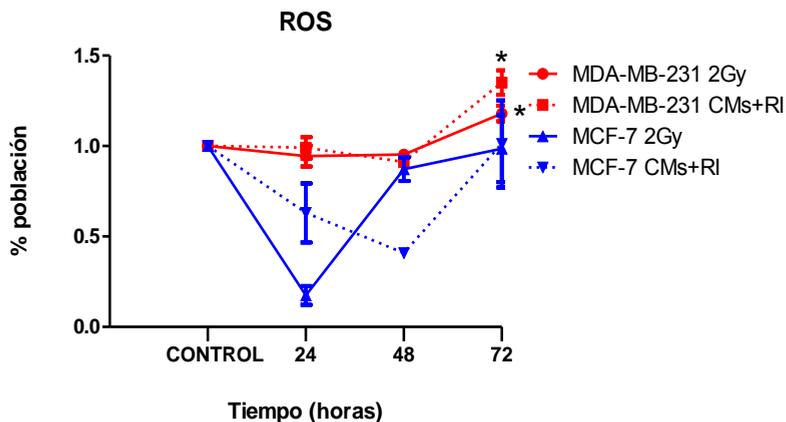


FIGURA 55. Especies reactivas de oxígeno. Media del porcentaje de células que expresan ROS para diferentes tiempos tras ser irradiadas (2 Gy) y ser tratadas con CMs, en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que expresan ROS. En el eje de abscisas se observa el tiempo transcurrido después del tratamiento. Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado.* $P < 0,05$ vs CONTROL.

En la figura 55, observamos un aumento de ROS en la línea celular MDA-MB-231, a las 72 horas, tras aplicar tanto RI como la combinación de RI con CMs, no encontramos cambios significativos en MCF-7 para ninguno de los tiempos analizados.

En la Figura 56 se representa el porcentaje de células que expresan radical superóxido medidos a diferentes tiempos en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después del tratamiento exclusivo con radiación y el tratamiento combinado con CMs y radiación.

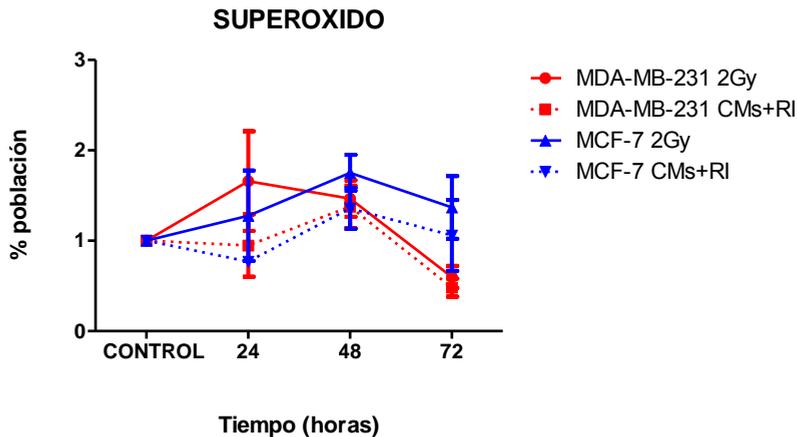


FIGURA 56. Anión superóxido. Media del porcentaje de células que expresan anión superóxido para diferentes tiempos, tras ser irradiadas (2 Gy) y ser tratadas con CMs, en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que expresan ROS. En el eje de abscisas se observa el tiempo transcurrido después del tratamiento. Los valores representan la media \pm DE de un experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL.

Se observa un aumento estadísticamente significativo de los niveles del anión superóxido a las 48 horas en la línea celular MDA-MB-231 tras la aplicación de ambos tipos de tratamiento. En la línea celular MCF-7, este aumento se encontró sólo tras el tratamiento con RI.

En la Figura 57 se representa el porcentaje de células que expresan conjuntamente ROS y el anión superóxido. Estos radicales se han medido para diferentes tiempos en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 después del tratamiento exclusivo con radiación y el tratamiento combinado con CMs y radiación.

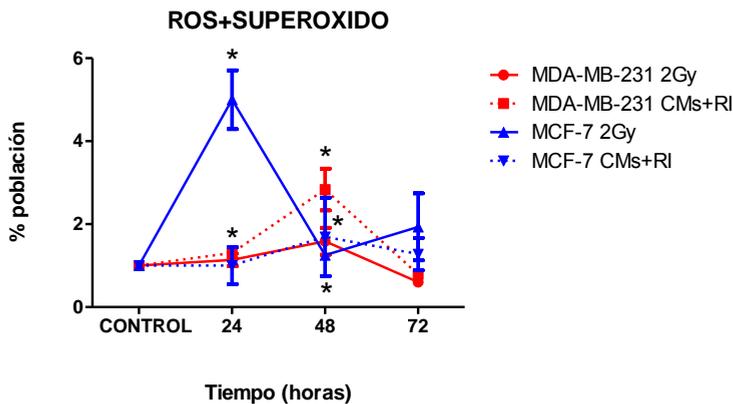


FIGURA 57. ROS y anión superóxido. Media del porcentaje de células que expresan conjuntamente ROS y anión superóxido para diferentes tiempos, tras ser irradiadas (2 Gy) y ser tratadas con CMs, en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de células que expresan ROS. En el eje de abscisas se observa el tiempo transcurrido después del tratamiento. Los valores representan la media \pm DE de un experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL.

Respecto a la medida de ROS y de anión superóxido, en ambas líneas celulares, pudimos observar un aumento a las 24 horas después del tratamiento con CMs combinado con RI. La línea celular MDA-MB-231 también mostró un incremento a las 48 horas tras la aplicación de ambos tipos de tratamiento. Sólo observamos un incremento a las 24 y 48 horas en la línea celular MCF-7 tras el tratamiento con RI.

1.3.- Medidas de la capacidad clonogénica de las células tras la aplicación de CMs y RI

La supervivencia celular de las líneas celulares se estimó mediante la realización de ensayos clonogénicos.

Los resultados mostraron que la línea celular MCF-7, tras el tratamiento combinado de campos electromagnéticos y radiación ionizante y el tratamiento sólo con radiación ionizante, presentaba una respuesta dosis-dependiente con valores más significativos a partir de la dosis de 4 Gy de RI.

En la tabla 33, se muestran los datos de los valores medios de la fracción de supervivencia celular y DE obtenidos al aplicar diferentes dosis de RI y tras el tratamiento combinado de CMs (50 Hz 100 G) y RI (2, 4 y 6 Gy) en la línea celular MCF-7. También se representan los valores de los parámetros α y β obtenidos tras el ajuste al modelo L-Q.

Tabla 33. Valores de la fracción de supervivencia celular

MCF-7 RI				
FS_{2Gy}	FS_{4Gy}	FS_{6Gy}	α (Gy⁻¹)	β(Gy⁻²)
0,40 ± 0,10	0,10 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,33 ± 0,11	-0,05 ± 0,04
MCF-7 RI y CMs				
FS_{2Gy}	FS_{4Gy}	FS_{6Gy}	α (Gy⁻¹)	β(Gy⁻²)
0,42 ± 0,07	0,11 ± 0,04	0,005 ± 0,00	0,31 ± 0,07	-0,06 ± 0,03

La figura 58 representa las curvas de supervivencia para la línea celular MCF-7 tras la aplicación de diferentes dosis de radiación así como la obtenida tras el tratamiento combinado con CMs (50 Hz/100 G) y RI.

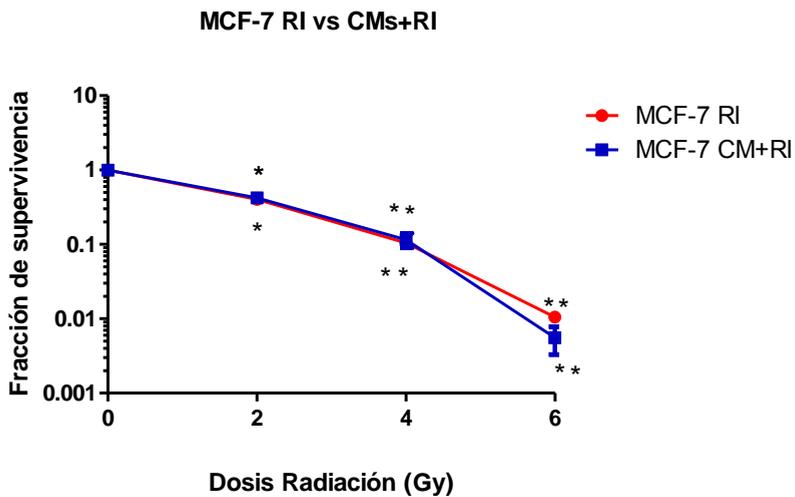


FIGURA 58. Curvas de supervivencia MCF-7 RI vs CMs y RI (50 Hz/100 G).

Valores medios de la fracción de supervivencia celular para diferentes dosis de RI y tratamiento con CMs (50 Hz 100 G) y RI, en la línea celular MCF-7. En el eje de ordenadas se muestra la fracción de supervivencia en escala logarítmica. En el eje de abscisas se observa las dosis de RI aplicadas. Los valores representan la media \pm DE de tres experimentos por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL. ** $P < 0,0001$ vs CONTROL

Se observa que el tratamiento con CMs origina un ligero incremento de la radiosensibilidad para la dosis de 6 Gy.

En la tabla 34 se muestran los datos de los valores medios de la fracción de supervivencia celular y DE obtenidos al aplicar diferentes dosis de RI y tras el tratamiento combinado de CMs (50 Hz 100 G) y RI (2, 4 y 6 Gy) en la línea celular MDA-MB-231. . También se representan los valores de los parámetros α y β obtenidos tras el ajuste al modelo L-Q.

Tabla 34: Valores de la fracción de supervivencia celular

MDA-MB-231 RI				
FS _{2Gy}	FS _{4Gy}	FS _{6Gy}	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
0,45 ± 0,07	0,16 ± 0,02	0,017 ± 0,01	0,30 ± 0,05	-0,042 ± 0,02
MDA-MB-231 RI y CMs				
FS _{2Gy}	FS _{4Gy}	FS _{6Gy}	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)
0,39 ± 0,08	0,11 ± 0,02	0,008 ± 0,00	0,35 ± 0,06	-0,049 ± 0,02

La figura 59 representa las curvas de supervivencia para la línea celular MCF-7 tras la aplicación de diferentes dosis de radiación así como la obtenida tras el tratamiento combinado con CMs (50 Hz/100 G) y RI.

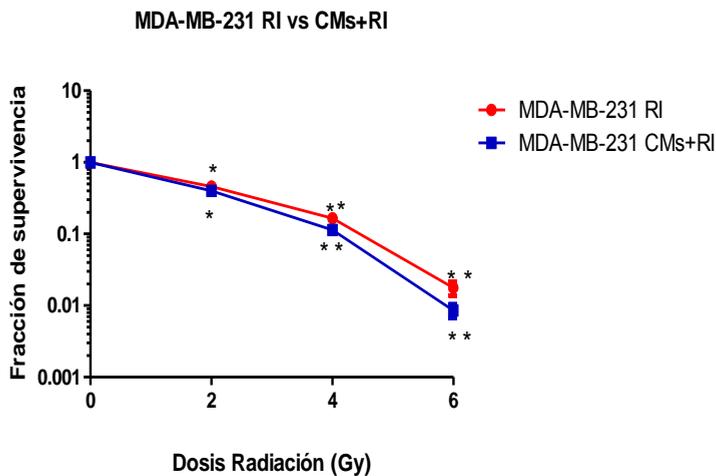


Figura 59. Media de la fracción de supervivencia celular medidas a diferentes dosis de RI y de ser tratadas con CMs (50 Hz 100 G) +RI, en la línea celular MDA-MB-231. En el eje de ordenadas se muestra la fracción de supervivencia en escala logarítmica. En el eje de abscisas se observa las dosis de RI aplicadas. Los valores representan la media \pm DE de un experimento por triplicado. * $P < 0,05$ vs CONTROL. ** $P < 0,0001$ vs CONTROL

Los resultados mostraron que en la línea celular MDA-MB-231, el tratamiento con CMs potencia del efecto de la radiación ionizante. Este efecto radiosensibilizante es dosis dependiente, siendo más acusado al administrar 6 Gy.

DISCUSIÓN

9.- DISCUSION

Los CMs en el ámbito de la Medicina física y Rehabilitación, se utilizan para el tratamiento de diferentes patologías. La aplicación terapéutica de los CMs, tiene una frecuencia comprendida entre 1-100 Hz y una intensidad inferior a 100 G. Sin embargo, no está demostrado que la utilización de una frecuencia u otra, sea más favorable clínicamente o ante un determinado proceso. Además, el resultado terapéutico depende de cómo se lleve a cabo la interacción con el tejido a tratar. Así, entre otras aplicaciones, los CMs se utilizan en el tratamiento de fracturas óseas, [IARC 2002], úlceras por presión, y en procesos de regeneración nerviosa, inflamatorios e infecciosos [Cossarizza et al., 1989, Simkó et al., 2004, Toro 1993].

Aunque no existe consenso de si los CMs atraviesan la membrana celular, se cree que, cuando lo hacen tienen dificultades para ello [Funk et al., 2009] y la posibilidad de penetración en el interior celular depende del tamaño de la célula y de la frecuencia de la corriente. La estimulación eléctrica provoca cambios en el pH y/o temperatura [Funk et al., 2009] y origina la formación de canales iónicos [Galvanovskis et al., 1997], contribuyendo a la desestabilización de la membrana celular.

Como ya se ha descrito anteriormente en esta memoria, los CEM actúan a nivel de la membrana celular, modificando su distribución iónica, ya que el medio extracelular tiene un predominio

de cargas + (mayor acúmulo de K^+ y Na^+), y en el medio intracelular hay predominio de cargas negativas - (A^- y Cl^-), lo que da lugar a la polarización de la membrana. La célula también dispone de un mecanismo activo de intercambio de iones que se llama bomba sodio-potasio. Cuando por cualquier motivo o lesión, se desencadena un proceso inflamatorio, se produce una alteración de la bomba sodio-potasio y de la distribución iónica en la membrana celular.

Las encargadas de transmitir las señales de los CMs, desde el lugar del receptor de la membrana, hasta el interior de la célula son las proteínas situadas en la bicapa lipídica. También la acción de los CMs se ejerce sobre los iones de calcio, favoreciendo la entrada de éstos en la célula, lo que supone un estímulo para procesos intracelulares, entre ellos, para distintas reacciones enzimáticas.

La aplicación de CMs, conlleva a una desregulación de canales iónicos por alteración de las hormonas y segundos mensajeros (Ca^{2+} o AMPc) [Pilla et al., 2011], que influyen en el Ca^{2+} y en su homeostasis [Aldinucci et al., 2000, Manikonda et al., 2007, Strauch et al., 2009], siendo los niveles de Ca^{2+} los que afectan a la inflamación, la proliferación y la apoptosis celulares [Sergeev et al., 1998]. Los CMs al influir sobre AMPc, provocan su desregulación [Schimmelpfeng et al., 1995, Manikonda et al., 2007] y esto tiene como consecuencia la expresión alterada de determinados genes lo que induce a la muerte por apoptosis y a la inhibición del desarrollo de algunos tumores [Dumaz et al., 2002, Rocha et al., 2008, Follin-

Arbelet et al., 2011].

Ha sido descrito que los CMs inducen una activación de la unión de AP-1, influyendo en los procesos de diferenciación y proliferación [Lin et al., 1998]. Además, alteran la polimerización de los microtúbulos y proteínas de RBS (subunidad de unión al ARN) disminuyendo el número células en la fase S [Lange et al., 2002].

Recordar también, que muchos átomos y moléculas son dipolos magnéticos, por lo tanto, al aplicar los CMs se produce una orientación y reorganización de las moléculas afectadas extendiéndose a niveles superiores (tejidos conectivo, muscular y a diferentes órganos), disminuyendo así la inflamación, el dolor y mejorando la circulación entre otros efectos.

Los CMs influyen en las propiedades piezoeléctricas del cuerpo, transformando de esta manera la energía química y electromagnética en energía mecánica y ésta en electromagnética [Toro 1993]. Entre las moléculas que pueden tener un comportamiento piezoeléctrico se encuentran, entre otras, las nucleoproteínas, el ADN y los microtúbulos.

El empleo de esta terapia ha sido ampliamente debatido desde que en 1960, varios trabajadores expuestos a este tipo de corriente, niños y adultos, que vivían cerca de instalaciones eléctricas, comenzasen a tener problemas de salud. Fue entonces cuando se

empezó a especular, si los CMs eran nocivos para la salud.

La bibliografía revisada para este trabajo de Tesis no solo documenta los efectos terapéuticos beneficiosos de los CMs sino que también pone de manifiesto la asociación del empleo de éstos con el desarrollo de carcinogénesis [Liburdy et al., 1993, Mccann et al., 1998, Vizcaino et al., 2003, Simkó et al., 1998, 2004, Simko et al., 2007].

Otro factor importante a tener en cuenta es si la exposición a CMs se realiza de manera puntual o continuada. Así, el estudio realizado por Ivancstis, refleja que tras la exposición a CEM continuos, las células de fibroblastos humanos muestran menos efectos genotóxicos que tras la aplicación de estas corrientes de forma intermitente donde observaron mayor incremento de rotura de cadena de ADN [Ivancstis et al., 2002] .

Este trabajo de investigación se ha centrado en la aplicación de ELF-CMs en dos líneas celulares de cáncer de mama, patología que supone el 30% de los tumores femeninos en mujeres con cáncer y en España se diagnostican unos 22.000 casos nuevos al año. De ahí que sea de suma importancia investigar sobre este tipo de tumor y encontrar tratamientos coadyuvantes con la Radioterapia.

El cáncer de mama está ligado a un desarreglo de estrógenos, es por esto que se han realizado investigaciones sobre los receptores de estrógenos y también sobre los CMs y su capacidad para estimular

la producción de estrógenos y para determinar la viabilidad del tumor respecto a ellos [Loberg et al., 2009, Girgert et al., 2009, Khaja et al., 2013, Chen et al., 2013]. Algunos autores ya han puesto de manifiesto el aumento de muerte celular (apoptosis) en MCF-7 al tratarlas con CMs y quimioterapia [Salvatore et al., 1994].

Otro aspecto importante a considerar en la aplicación de los CMs (que no ha sido objeto de estudio en este trabajo de investigación) dentro del tratamiento combinado con radiación para sugerir el empleo de CMs en la mejora de la respuesta terapéutica, es que el efecto sea selectivo y se consiga sólo en células tumorales sin afectar a las sanas. Esto ha sido demostrado por Crocetti, al aplicar CMs de 20 Hz y 3 G durante 1 hora diaria tanto en células tumorales (MCF-7) como normales (MCF 10). Además, este efecto ha sido más acentuado alcanzando la significación estadística tras la exposición celular a CMs durante tres días consecutivos [Crocetti et al., 2013].

Por todo lo anteriormente expuesto, y considerando que la mayoría de los trabajos publicados en este campo se han llevado a cabo con intensidades muy bajas (10 G) y frecuencias de 50-60 Hz hemos querido determinar la influencia de los efectos de CMs de diferentes frecuencias e intensidades sobre la progresión de las células a lo largo del ciclo, el metabolismo oxidativo y los cambios en supervivencia celular tras el tratamiento con CMs combinado con radiación.

9.1.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día)

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación han puesto de manifiesto un efecto sobre la parada de las células en la fase G1 del ciclo tras exposición a CMs durante 30 minutos. Este bloqueo depende tanto de la línea celular como de las intensidades y frecuencias a las que han sido expuestas las células.

El acúmulo de las células en la fase G1, puede ser debido a que los CMs provocan modificaciones en la expresión de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular (ciclinas, CDKs, p21, p16) [Lange 2002, Simkó et al., 2004]. Se ha descrito que la melatonina, en MCF-7, actúa sobre la proteína p53, activándose la transcripción de p21 que se une a los complejos ciclina D/cdk4-6 [Cos et al., 2003]. Otros autores han documentado que los CMs provocan una disminución de los niveles de melatonina, que a su vez afecta a la progresión de las células a través del ciclo celular [Liburdy et al., 1993, Löscher et al., 1994, Mediavilla et al., 2010].

Investigaciones previas han puesto de manifiesto que el tratamiento con CMs (50 Hz) provoca una expresión de diferentes genes que intervienen en la parada del ciclo celular relacionada con el daño inducido en células madre embrionarias de ratón [Nikolova T et al., 2005]. Otros autores han descrito que la exposición a CMs (50 Hz) influyen en la progresión del ciclo celular aumentando la expresión de diferentes proteínas entre las que se encuentra p21 en

células deficientes en p53, destacando la importancia del estado de este gen en la regulación del ciclo celular [Czyz et al., 2004]. Marcantonio [Marcantonio et al., 2010] utilizando ese mismo rango de frecuencias y combinando el empleo de CMs con ácido retinoico en líneas celulares de neuroblastoma humano, encontraron bloqueo celular en la fase G1 comparado con cada tratamiento aplicado de forma individual. La investigación llevada a cabo por Patruno [Patruno et al., 2011] sugiere una relación entre la exposición a CMs, la distribución en el ciclo y la proliferación celulares.

Recientemente Ma [Ma et al., 2014], utilizando como modelo células madre embrionarias neuronales, han descrito que el empleo de ELF-CEM de diferentes intensidades y tras distintos tiempos de exposición no provoca efectos sobre la proliferación celular ni sobre la progresión de las células a lo largo del ciclo.

Nuestros resultados han reflejado que la línea celular MCF-7 mostró más paradas en la fase G1 que la MDA-MB-231 para la mayoría de condiciones experimentales utilizadas. En este sentido, el bloqueo se produce con más asiduidad en las primeras horas, concretamente 4 horas y también a partir de las 44 horas tras exposición a CMs. La única condición experimental de las ensayadas en que no se observó parada en esta fase del ciclo, fue cuando se aplicaron 100 Hz y 80 G (figura 25).

La falta de bloqueo en G1 ha sido descrita por Ding, en las

células MCF-7 en la fase G1 del ciclo, tras la aplicación de CMs de frecuencias e intensidades parecidas a las utilizadas por nosotros. Estos autores justificaron este hallazgo midiendo la proteína p21 y observaron que la exposición a CEM no afecta a la expresión de la misma [Ding et al., 2001]. Otros autores han atribuido la no parada en esta fase a una reorganización de los componentes del citoesqueleto después de la aplicación de los CEM [Santoro et al., 1997, Pokorny et al., 2012].

Con respecto a la línea celular MDA-MB-231, se observaron menos paradas en la fase G1 comparada con la MCF-7 y cuando se produjeron, se llevaron a cabo a tiempos más largos tras la utilización de CMs. Concretamente, a las 44 horas para la mayoría de intensidades y frecuencias aplicadas. La revisión de la literatura sobre exposición a ELF-EMF ha puesto de manifiesto que no existen trabajos que relacionen esta línea celular con las alteraciones a lo largo del ciclo.

Con respecto a las fases S y G2/M, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral ponen de manifiesto que la exposición a CMs de 50 Hz y 80 G provoca acumulación de las células MCF-7 en la fase G2/M del ciclo celular. Considerando la línea celular MDA-MB-231, el bloqueo en esta fase se origina cuando el CM aplicado es de 25 Hz y 80 G. No se han encontrado alteraciones en la distribución en la fase S para ninguno de los dos modelos celulares utilizados.

Algunos autores que describen parada en las fases S y G2/M, tras la aplicación de CM, tal es el caso de Wolf, quien, utilizando como modelo, la línea celular de fibroblastos Rat-1 y células de Leucemia HL-60, observaron cómo tras la exposición a CMs (50 Hz 0.5-1 mT: 5-10 G), se inducía un incremento de células en la fase S a las 12 y 48 horas tras la exposición a este agente [Wolf et al., 2005]. Otros autores encuentran un incremento en el porcentaje de células en la fase S del ciclo celular en la línea celular NB69 de neuroblastoma humano tras la exposición a CMs intermitentes de 50 Hz de frecuencia y 100 μ T (1 G) de intensidad por activación de la vía de señalización MAPK-ERK1/2 [Martinez et al., 2012].

Otros autores describen una disminución de la proliferación celular como consecuencia de un incremento del número de células en la fase G2/M tras la aplicación de CEM (50 Hz y 2 mT: 20 G) en las líneas celulares HUVECs (células endoteliales de vena umbilical humana) y MS-1 (células endoteliales “transformadas” de ratones), por una sobreexpresión de la proteína hsp70 [Delle Monache et al., 2013]. De la misma manera, también ha sido documentado que al someter a la línea celular de leucemia K562 a CMs (50 Hz 0.025-0.1 mT: 0,25-1 G), se produce un incremento de células en la fase G2 junto con un incremento de los niveles de la proteína hsp70 [Mannerling et al., 2010].

9.2.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/4 días)

En la actualidad y desde hace varios años, se investigan si los CMs afectan a la fisiología y proliferación celulares. Los resultados no son concluyentes y además son contradictorios. Se han descrito efectos a corto plazo tras exposición a CMs sobre la membrana celular (hormonas, enzimas) asociados a frecuencias e intensidades bajas [Vizcaino et al., 2003]. Sabemos que los CMs son responsables de generación de radicales libres, que influyen en la concentración de Ca^{++} y en el transporte celular. Todo esto está relacionado con el ciclo, la proliferación y la viabilidad celulares, algunos autores han estudiado los efectos de la exposición a CMs (50 Hz 20 0 500 μ T: 0,2-5 G) a corto (1 día) y largo (4 días) plazo tanto en fibroblastos como en células tumorales humanas (MCF-7), y no han encontrado diferencias significativas en ninguna de las dos líneas celulares tras la exposición a CMs al analizar tanto el crecimiento como la viabilidad celulares. Otros autores han documentado que la tras exposición prolongada a CMs (3 días) en líneas celulares tumorales HL-60, MCF-7, K-562, A-375 y H4) no afecta ni a la proliferación ni al crecimiento celulares [Yoshizawa et al., 2002].

Nuestros resultados reflejan la distribución de las células a lo largo del ciclo es la misma tras la exposición a CMs durante 30 minutos a lo largo de 4 días comparada con el grupo control no expuesto, en las dos líneas celulares tratadas, con independencia de la frecuencia y la intensidad de CEM utilizadas.

En resumen, tras la revisión de la literatura y considerando diferentes condiciones de frecuencia e intensidad de los CMs aplicados, se podría justificar la controversia encontrada en una misma línea celular asociada a la hipótesis de la “*ventana biológica*”, y en particular a la hipótesis de la “*ventana de amplitud*” que postula que los resultados encontrados dependen del estado metabólico en el que se encuentran las células de manera que, dada la heterogeneidad de la población celular, existe un equilibrio entre proliferación y apoptosis, con lo que los CMs sólo afectarían a una pequeña proporción de células con un estado metabólico determinado o a aquellas que se encuentren en fases concretas del ciclo celular. Por otra parte, estos resultados se verían modificados al variar la duración de la exposición a CEM [Delle Monache et al., 2013].

9.3.- Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de RI

La respuesta al tratamiento con RI depende de la sensibilidad del tejido que se irradia, que a su vez está determinada por la sensibilidad de las células que forman parte del mismo que, además, varía según la fase del ciclo celular en el que se lleva a cabo la irradiación. Por otra parte, y como ya se ha mencionado en el apartado de introducción de esta memoria, el buen funcionamiento de los puntos de control permiten la parada de las células tras este tratamiento, favoreciendo el proceso de reparación. La capacidad de reparación de las lesiones celulares depende, entre otros factores,

del tipo celular estudiado [Bayo et al., 2001]. En este sentido, aquellas células con menor capacidad de reparación del daño radioinducido muestran una mayor radiosensibilidad [Núñez et al., 1996, Bayo et al., 2001]. Por otra parte, el fraccionamiento de la dosis permite además, disminuir la toxicidad en el tejido sano como consecuencia de un aumento del proceso de reparación en el mismo, efecto que es mucho más acusado que en el tejido tumoral. Con bastante frecuencia los puntos de control del ciclo aparecen alterados en el tejido tumoral, hecho que favorece la no parada de estas células en el mismo y va a permitir que la siguiente fracción de la dosis se administre en fases del ciclo en las que estas células son más sensibles a la radiación, minimizando por tanto la repoblación celular en el tumor durante el tiempo de duración del tratamiento [Huber et al., 2013, Ma et al., 2014].

La radiación ionizante, como ya hemos comentado en el **apartado 3.1**, provoca una serie de cambios físicos (la excitación de electrones conlleva a una expulsión de los mismos a niveles más altos, ionizando a los átomos), y como consecuencia, se producen una serie de cambios químicos, entre ellos, la generación de radicales libres, que desencadenan procesos enzimáticos, dañando el ADN y por tanto afectando a la supervivencia celular [Alberts et al., 1999].

Existen numerosos estudios en los que se pone de manifiesto que la exposición de células a radiación ionizante, provoca parada de las mismas en la fase G2, como es el caso de los osteoblastos

(MC3T3-E1), que tras ser irradiados (4-8 Gy) muestran una parada en esta fase disminuyendo así su tasa de proliferación [He et al., 2011]. Nuestros resultados ponen de manifiesto un aumento del porcentaje de las células MDA-MB-231 en la fase G2 (figura 52), resultados que concuerdan con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación [Siles et al., 1996], que también han sido corroborados por Lange utilizando células de líquido amniótico humano [Lange et al., 2004]. Respecto a la línea celular MCF-7, no hemos obtenido parada en la fase G2. En el mismo sentido, otros autores no han observado parada en esta fase al aplicar RI (0-6 Gy) en células de leucemia mieloide crónica [Palme et al., 2013]. Por el contrario, Kim, tras irradiar estas células con diferentes dosis de RI si observó un incremento de la población celular en la fase G2/M [kim et al., 2010].

Con respecto a la fase G1, nuestros resultados han puesto de manifiesto que sólo uno de los modelos celulares utilizados en este trabajo (MCF-7) muestra parada en esta fase (figura 49), coincidiendo con los previamente descritos por nuestro grupo [Siles et al., 1996] y por otros autores [Lange et al., 2004].

9.4.-Medidas de citometría de flujo tras la aplicación de los CMs (30 minutos/1 día) y radiación ionizante

En la literatura científica existen pocos estudios que documenten los diferentes efectos encontrados “in vitro” con respecto al tratamiento combinado de CMs y RI.

La respuesta a radiación depende de la fase del ciclo en la que se irradian las células, siendo éstas más radiosensibles si se encuentran en la fase G2/M del ciclo celular [Jeggo et al., 2009].

En nuestros resultados considerando la línea celular MCF-7 (figura 50), no se observa parada en ninguna de las fases del ciclo celular tras la aplicación del tratamiento combinado de CM y RI. Por el contrario, tal y como podemos observar en la figura 53, en la línea celular MDA-MB-231, la aplicación de CM y RI provoca un bloqueo del ciclo en las fases G1 y G2/M. Existe poca bibliografía que documente los efectos in vitro del tratamiento combinado de CMs y RI. Lange ha descrito que la combinación de CM (50 Hz 1 mT: 10 G) y RI no afecta a la distribución del ciclo celular en las células humanas de líquido amniótico [Lange et al., 2004]. Nuestros resultados han sido corroborados por Ding que describe que la línea celular MCF-7, al ser tratada con CM (60 Hz y 5 mT: 50 G) y radiación ionizante (4 Gy), no muestra paradas del ciclo en las fases G1 y G2 [Ding et al., 2001]. Tian, encontró que la exposición de CM (60 Hz) seguida de RI (1 Gy) en células con la proteína de reparación Ku80 alterada (xrs5), influyó en el ciclo celular, disminuyendo ligeramente la parada en G1 originada tras irradiación, disminuyendo de forma transitoria la apoptosis inducida por radiación [Tian et al., 2002], afectando por tanto a la respuesta celular a la radiación.

9.5.- Medidas Estrés oxidativo tras la aplicación de RI y el tratamiento combinado con CMs y RI

Los radicales libres, pueden dañar y romper la molécula de ADN, produciendo mutaciones y afectando a los procesos de división celular y apoptosis, actuando como agentes genotóxicos e influyendo, por tanto, en el desarrollo tumoral. Se ha demostrado que los CMs interfieren con las moléculas intracelulares provocando reacciones químicas que implican la producción de radicales libres, que, a su vez, interactúan con el ADN y otros radicales hidroxilo, provocando roturas simples y dobles de cadena, favoreciendo con esto el desarrollo del proceso de carcinogénesis. Ha sido descrito que los CMs producen radicales superóxido, y ROS, y esto induce daño en la molécula de ADN [Ríos-Arrabal et al., 2013]. Sin embargo, las células disponen de sistemas de defensa para protegerse de cualquier estrés/o agente externo que provoque aumento de ROS y desencadene cáncer [Marnett et al., 2000, Anastassopoulou et al., 2002, Hong et al., 2012, Ríos-Arrabal et al., 2013].

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que la exposición a CMs (50 Hz y 100 G) previa a RI (2 Gy) provocó un aumento estadísticamente significativo de los niveles del anión superóxido a las 48 horas tras la aplicación de ambos tipos de tratamiento en la línea celular MDA-MB-231. En la línea celular MCF-7, este aumento se encontró sólo tras el tratamiento con RI. Además, observamos un aumento de ROS en la línea celular MDA-

MB-231, a las 72 horas, tras aplicar tanto RI como la combinación de RI con CM. No encontramos cambios significativos en MCF-7 para ninguno de los tiempos analizados.

De la misma manera, otros autores describieron que la exposición a CMs (50 Hz 1 mT: 10 G) en la línea celular MCF10A, no provocó cambios ni en la producción de ROS ni en la actividad enzimática de superóxidos [Hong et al., 2012].

Saenko, en su estudio realizado en células leucémicas humanas, encontró que después de aplicar sólo RI (12 Gy), se activa la producción de ROS y RNS [Saenko et al, 2013]. En este sentido, Yamamori, observa que tras irradiar con una dosis de 10 Gy la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549, se produce un incremento de ROS, que a su vez se relacionaba con un mayor acumulo de células en la fase G2/M [Yamamori et al., 2012].

Ha sido también descrito como el uso de CMs (40 Hz 7 mT: 70 G y 30 minutos/día durante 2 semanas) apenas genera ROS en homogenados de tejido cardíaco de ratas, pero por el contrario cuando el tiempo de exposición se prolonga a 60 minutos/día durante dos semanas, se incrementa la generación de ROS, disminuyéndose la capacidad antioxidante en el plasma de las ratas [Goraca et al., 2010]. De igual forma, Manikonda observa que tras la exposición continuada (90 días) a CMs (50 Hz 50 y 100 G) se origina un incremento de ROS en diferentes tejidos de ratas expuestas a la radiación no ionizante

[Manikonda et al., 2007]. En nuestro estudio de Tesis Doctoral, podemos observar que la generación de radicales libres en ambas líneas celulares, se produce también en las exposiciones de tiempo prolongadas (48 y 72 horas), tanto con la RI como en el caso del tratamiento combinado con CMs y RI.

9.6.- Medidas de la capacidad clonogénica de las células tras la aplicación de CMs y RI

La gran controversia encontrada en los estudios hasta ahora realizados sobre los efectos celulares de CMs en combinación con RI, se debe a las diferentes características relacionadas con el tratamiento empleado tales como la frecuencia e intensidad de campo, la dosis de RI así como la secuencia de aplicación de ambos agentes físicos. Además, a la hora de determinar estos efectos, también es importante tener en cuenta el tipo celular sobre el que se realiza el estudio.

Ha sido descrito que los CMs no transmiten energía suficiente para romper los enlaces químicos de la molécula de ADN (IARC) y, por tanto, sería poco probable que causen lesiones directa en ésta. Sin embargo, también se ha documentado que los CMs aumentan la tasa de mutación en el ADN de las células tras exponerlas a RI [Miyakoshi et al., 1999, Mairs et al., 2007, Artacho-Cordón et al., 2013]. Otros autores han evidenciado la capacidad mutagénica de los CMs (50 Hz 1 mT: 10 G) por si solos y tras la aplicación combinada con RI (0,3-3 Gy),

encontrando mayor tasa de mutación para las dosis más bajas de RI (hipermutabilidad) en células de glioma humano [Mairs et al., 2007].

Otros autores han observado un aumento de frecuencia de mutaciones en células CHO-K1 al aplicar CMs de baja frecuencia y 5mT de intensidad, conjuntamente con la RI [Miyakoshi et al., 1999]. Ding describe que la aplicación de los CMs (60 Hz 5 mT: 50 G) pueden inducir mutaciones así como aumentar la frecuencia de las mismas, tras el empleo de RI (4 Gy) en células humanas de glioma [Ding et al., 2000].

Como se ha detallado en el apartado de introducción de esta Tesis Doctoral, tras irradiación, las células ponen en marcha lo que se conoce como respuesta al daño tras radiación. Dicha respuesta se inicia con la señalización de daño a través de la fosforilación de la histona H2AX y, posteriormente, los efectos finales de parada en diferentes fases del ciclo, reparación del daño y activación de diferentes mecanismos de muerte celular. La respuesta de las células a radiación viene, en gran parte, determinada por el estado de la fosforilación de la histona H2AX, de forma que cuando esta proteína está ausente o no funciona correctamente las células muestran mayor radiosensibilidad. Algunos autores encontraron una mayor expresión de γ -H2AX al aplicar CMs de 60Hz y 2 mT conjuntamente con RI, por lo que podemos considerar que los CEM potencian el daño al ADN inducido por la RI. Por el contrario, otros autores, no encontraron mayor expresión de γ -H2AX tras la exposición a los CMs

(60 Hz 2 mT: 20 G) ni en fibroblastos (WI-38) ni en células epiteliales (L132) de pulmón humano [Yoon et al., 2014].

Se ha documentado que los CMs potencian el daño inducido por radiación. Así, se ha descrito que los CMs mejoran la citotoxicidad y genotoxicidad de la RI [Manti et al., 2010] al aumentar la formación de micronúcleos, consiguiendo finalmente un aumento de la tasa de apoptosis [Lagroye et al., 1997, Ding et al., 2003]. Por otro lado, otros autores han concluido que los CMs no tienen efecto sinérgico con la RI y, por tanto, no influyen significativamente en la formación de aberraciones cromosómicas [Maes et al., 2000]. Stronati et al., estudiaron la genotoxicidad en linfocitos al aplicarles CMs (50 Hz 1 mT: 10 G 12h) y RI y no observaron cambios en la frecuencia de mutación [Stronati et al., 2004].

Con respecto a la muerte por apoptosis, se ha descrito que la inducción de este tipo de muerte vendría dada porque al exponer las células a los CM y RI, actúan sobre Erg1, favoreciendo las rutas de señalización de la apoptosis, debido a la activación de p53 mediada por p38 [Ahmed et al., 1997,2004, Buttiglione et al., 1997, Wood et al., 2009, Kim et al., 2010, Wang et al., 2011, De la Cruz-Morcillo et al., 2011,2013, Dickinson et al., 2011].

Los resultados descritos hasta la fecha han puesto de manifiesto efectos celulares de los CMs tanto si éstos se aplican antes como después de la RI. En este sentido, algunos autores defienden la

aplicación de CMs previo a la irradiación debido a la capacidad que presentan éstos para potenciar la reactividad de ROS originadas por RI, y atribuyen los diferentes efectos biológicos encontrados a la capacidad de los CMs para provocar cambios en los niveles de compuestos oxidantes y antioxidantes [Simko, 2007]. Otros estudios han mostrado que la aplicación de CMs previa a la exposición con RI influye en la polimerización de microtúbulos contribuyendo al aumento de muerte celular por apoptosis, y por tanto, al aumento de la radiosensibilidad celular [Joiner 2009]. Se ha descrito que la aplicación de CMs (50 Hz y 10 G) previa al tratamiento con RI disminuye la proliferación celular [Stronati et al., 2004].

Algunos autores han puesto de manifiesto el efecto genotóxico de los CMs al ser aplicados junto con radiación ionizante (rayos X) en células CHO. Para ello, emplearon CM de 60 Hz y 5 G que aplicaron antes y después de la irradiación celular (1 Gy). Sus resultados han reflejado un mayor efecto genotóxico de los CMs sólo cuando la exposición a los mismos se realiza después de la irradiación celular en comparación con el tratamiento sólo con RI [Ding et al., 2003]. Estos mismos autores han descrito un aumento en la tasa de mutación encontrada después de esta secuencia de aplicación del tratamiento [Ding et al., 2001]. En contraposición, este mismo grupo también documenta una inhibición transitoria de la muerte por apoptosis radioinducida por aplicación de CMs tras la irradiación de células MCF-7, asociando este efecto a alteraciones en la expresión de genes que intervienen en este tipo de muerte celular, concretamente, se

produce una elevación de la proporción Bcl-2/Bax [Ding et al., 2001]. Tian et al., observaron que al exponer las células Xrs5 a CMs (60 Hz) después de la irradiación (1 Gy), éstos disminuyen el bloqueo radioinducido en la fase G1, provocando mayor expresión de Bcl-2. También se ha descrito una disminución significativa en p21, p53, caspasa3, al irradiar con 8 Gy a las mismas células y exponerlas 5 horas después a CMs [Tian et al., 2002].

Otros autores han observado que la aplicación de los CMs (5 G) post-irradiación aumenta el número de mutaciones inducidas por los rayos X (4 Gy), defendiendo la aplicación de éstos después del tratamiento con RI para potenciar el efecto de ésta [Koyama et al., 2005, Cameron et al., 2005].

Wen et al., han demostrado realizando estudios in vivo que, la irradiación (4 Gy) de tumores seguida de exposición a CMs (100 Hz), durante varios días, mejora la supervivencia en modelos animales e inhibe el crecimiento de hepatomas implantados en ratones [Wen et al., 2011].

Nuestros datos, obtenidos tras aplicar CMs 4 horas antes del tratamiento con radiación (2 Gy) reflejan que la supervivencia celular de la línea MCF-7 disminuye al ser tratada con CMs (50 Hz 100 G) y RI (figura 58). Este efecto radiosensibilizante es más acusado en la línea celular MDA-MB-231 (figura 59), probablemente debido a niveles mayores de ROS y un menor bloqueo en las diferentes fases del ciclo

celular tras el tratamiento combinado de CMs y RI, hecho que probablemente está favoreciendo la mayor radiosensibilidad celular en este modelo.

Según todo lo anteriormente descrito y tras el análisis de nuestros resultados y los encontrados por otros autores, entendemos que, la respuesta celular debida al empleo combinado de CMs y RI va a depender tanto del modelo celular ensayado como de la frecuencia, intensidad, duración de aplicación del campo y de la secuencia de aplicación de ambos tratamientos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La exposición a CMs de diferentes frecuencias e intensidades influye sobre la progresión de las células a lo largo del ciclo celular. Las alteraciones producidas van a depender de la frecuencia e intensidad del campo aplicado y del tipo celular ensayado.
2. Para la mayoría de las frecuencias e intensidades de campo utilizadas en este trabajo de Tesis Doctoral, un mayor porcentaje de células MCF-7 se acumulan en la fase G1 comparado con la proporción de células MDA-MB-231 encontrada en esta fase, dependiendo este bloqueo del estado de la proteína p53. Además, la parada de las células MCF-7 en G1, se produce con mayor frecuencia a 4 y a 48 horas. En el caso de células MDA-MB-231, este bloqueo, cuando se origina, se lleva a cabo a las 44 horas después del tratamiento.
3. La exposición a CMs de 50 Hz y 80 G provoca acumulación de las células MCF-7 en la fase G2/M del ciclo celular. Considerando la línea celular MDA-MB-231, el bloqueo en esta fase se origina cuando el CM aplicado es de 25 Hz y 80 G.
4. Las medidas de distribución celular en el ciclo tras exposición a CMs de 50 Hz y 100 G, durante 30 minutos, aplicados a lo largo de cuatro días consecutivos, han puesto de manifiesto que, la exposición continuada a éstos, no altera la proporción de las células en las

distintas fases del ciclo, para ninguno de los dos modelos celulares ensayados, a las 24 horas después de la aplicación del CM.

5. El tratamiento combinado de CMs (50 Hz/100 G) con radiación ionizante provoca un bloqueo en las fases G1 y G2/M del ciclo en el caso de la línea celular MDA-MB-231. No se observa esta respuesta en la línea celular MCF-7, de manera que, en estas células, la exposición combinada a CMs y radiación no potencia la parada celular en las diferentes fases del ciclo encontradas con el tratamiento exclusivo con radiación.

6. Los CMs potencian la formación del anión superóxido y de ROS generados por la radiación ionizante, a las 48 y a las 72 horas respectivamente tras irradiación, en la línea celular MDA-MB-231.

7. El tratamiento con CM previo a la irradiación celular aumenta la respuesta de las células MDA-MB-231 a la radiación ionizante. El efecto radiosensibilizante, ejercido como consecuencia de la aplicación de CMs, es dosis dependiente, aumentando conforme lo hace la dosis de radiación, siendo más acusado para 6y. No se ha observado esta radiosensibilización en la línea celular MCF-7.

8. La exposición a CMs influye en la respuesta de las células MDA-MB-231 a radiación ionizante, modificando su supervivencia celular tras irradiación. Esta respuesta vendría, en parte, determinada por las alteraciones que los CMs provocan en la progresión del ciclo

celular y por la generación de ROS que, a su vez, dependen del tipo celular que está siendo tratado.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- Campos electromagnéticos (CEM)
- Campos magnéticos (CMs)
- Campo magnético (CM)
- Radiación ionizante (RI)
- Acido desoxirribonucleico (ADN)
- Frecuencia (Fr)
- Gauss (G)
- Tesla (T)
- Microtesla (μ T)
- Voltios/metro (V/m)
- Corriente electromagnética (EMF)
- Campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (ELF-CEM)
- Campos electromagnéticos de frecuencia baja (LF-CEM)
- Campos electromagnéticos de frecuencia intermedia (IF-CEM)
- Radiofrecuencia (RF-CEM)
- Microondas y Rádar (MW-EMF)
- Tratamiento del tumor con campo eléctrico (TTfield)
- Radioterapia (RT)
- Especie Reactiva de Oxígeno (ROS)
- Magnetita biogénica (Fe_3O_4)
- Calcio (Ca^{2+})
- Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)
- Quinasa regulada por señales extracelulares (ERK)

- Adenosín monofosfato cíclico: nucleótido, segundo mensajero (AMPc ó cAMP)
- Doble rotura de cadena de ADN (DBS)
- AC (Corriente alterna)
- CW (onda continua)
- GSH (glutati3n reducido)
- iNOS (inducible 3xido n3trico sintetasa)
- rms (root media cuadr3tica)
- S (densidad de potencia)
- SAR (tasa de absorci3n)
- SOD (super3xido dismutasa)
- Quinasa dependiente de la ciclina (CDK)
- Gen humano codifica a un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (p21)
- Prote3na supresora de tumores (p16)
- Gen supresor tumoral (p53)
- Receptor estr3geno (ER)
- Complejo estradiol respuesta estr3genos (ERE)
- N-tert-Butyl- α -phenylnitrono:rotador de radicales libres (PBN)
- Canales de calcio operados por voltaje (COV)
- Retinoblastoma (Rb)
- Prote3nas quinasas activadas por mit3genos (p38)
- C-Jun N quinasas-terminales (SAPK/JNK)
- Factor de crecimiento epid3rmico (EGF)
- Factor de transcripci3n (AP-1)
- Prote3na codificada en humanos por el gen Fos (c-Fos)

- Gen que codifica a la proteína c-Jun (C-Jun)
- Ácido ribonucleico (ARN)
- Subunidad de unión a ARN (RBS)
- Subunidad reguladora de unión (RS)
- Proteína que permeabilizan mitocondria y es punto clave en la apoptosis (Bcl-2)
- Especie reactiva nitrógeno (RNS)
- Ácido tiobarbiturico (TBARS)
- Matriz metaloproteasas (MMPs)
- Complejo de reconocimiento del origen de replicación (ORC)
- Adenosin trifosfato, nucleótido para obtención energía celular (ATP)
- Plasmiogeno (PA)

BIBLIOGRAFIA

1. Ahlbom, I. C., Cardis, E., Green, A., Linet, M., Savitz, D., Swerdlow, A., & ICNIRP (International Commission for Non-Ionizing Radiation Protection) Standing Committee on Epidemiology. (2001). Review of the epidemiologic literature on EMF and Health. *Environmental Health Perspectives*, 109(Suppl 6), 911.
2. Ahmed, M. M. (2004). Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Current cancer drug targets*, 4(1), 43-52.
3. Ahmed, M. M., Sells, S. F., Venkatasubbarao, K., Fruitwala, S. M., Muthukkumar, S., Harp, C., ... & Rangnekar, V. M. (1997). Ionizing radiation-inducible apoptosis in the absence of p53 linked to transcription factor EGR-1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33056-33061.
4. Ahmed, M. M., Venkatasubbarao, K., Fruitwala, S. M., Muthukkumar, S., Wood Jr, D. P., Sells, S. F., & Rangnekar, V. M. (1996). EGR-1 induction is required for maximal radiosensitivity in A375-C6 melanoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29231-29237.
5. Alberts, G., Alberts, B., Karp, G., & Lodish, H. (1999). *Biología Celular y Molecular*. Edit. Interamericana, 4ª edición en español.
6. Aldinucci, C., Palmi, M., Sgaragli, G., Benocci, A., Meini, A., Pessina, F., & Pessina, G. P. (2000). The effect of pulsed electromagnetic fields on the physiologic behaviour of a human astrocytoma cell line. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1499(1), 101-108.

7. Amara, S., Douki, T., Ravanat, J. L., Garrel, C., Guiraud, P., Favier, A., & Abdelmelek, H. (2007). Influence of a static magnetic field (250 mT) on the antioxidant response and DNA integrity in THP1 cells. *Physics in medicine and biology*, 52(4), 889.
8. Anastassopoulou, J., & Theophanides, T. (2002). Magnesium–DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42(1), 79-91.
9. Ansari, R. M., & Hei, T. K. (2000). Effects of 60 Hz extremely low frequency magnetic fields (EMF) on radiation-and chemical-induced mutagenesis in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 21(6), 1221-1226.
10. Askoxylakis, V., Jensen, A. D., Häfner, M. F., Fetzner, L., Sterzing, F., Heil, J., & Hof, H. (2011). Simultaneous integrated boost for adjuvant treatment of breast cancer-intensity modulated vs. conventional radiotherapy: The IMRT-MC2 trial. *BMC cancer*, 11(1), 249.
11. Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., & Straif, K. (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *The lancet oncology*, 12(7), 624-626.
12. Barbault, A., Costa, F. P., Bottger, B., Munden, R. F., Bomholt, F., Kuster, N., & Pasche, B. (2009). Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1), 1-10.

13. Bayo, N. (2001). Reacción celular ante la radiación. *Radiobiología*, 1(1), 9-11.
14. Blank, M., & Goodman, R. (2009). Electromagnetic fields stress living cells. *Pathophysiology*, 16(2), 71-78.
15. Buscà, R., Abbe, P., Mantoux, F., Aberdam, E., Peyssonnaud, C., Eychène, A., & Ballotti, R. (2000). Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *The EMBO journal*, 19(12), 2900-2910.
16. Buttiglione, M., Roca, L., Montemurno, E., Vitiello, F., Capozzi, V., & Cibelli, G. (2007). Radiofrequency radiation (900 MHz) induces Egr-1 gene expression and affects cell-cycle control in human neuroblastoma cells. *Journal of cellular physiology*, 213(3), 759-767.
17. Cagni, E., Remondini, D., Mesirca, P., Castellani, G. C., Verondini, E., & Bersani, F. (2007). Effects of exogenous electromagnetic fields on a simplified ion channel model. *Journal of biological physics*, 33(3), 183-194.
18. Calvente, I., Fernandez, M. F., Villalba, J., Olea, N., & Nuñez, M. I. (2010). Exposure to electromagnetic fields (non-ionizing radiation) and its relationship with childhood leukemia: a systematic review. *Science of the total environment*, 408(16), 3062-3069.
19. Cameron, I. L., Sun, L. Z., Short, N., Hardman, W. E., & Williams, C. D. (2005). Therapeutic Electromagnetic Field (TEMF) and gamma irradiation on human breast cancer xenograft growth, angiogenesis and metastasis. *Cancer Cell Int*, 5, 23.

20. Cao, Y., Zhang, W., Lu, M. X., Xu, Q., Meng, Q. Q., Nie, J. H., & Tong, J. (2009). 900-MHz microwave radiation enhances γ -ray adverse effects on SHG44 cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(11-12), 727-732.
21. Caraglia, M., Marra, M., Mancinelli, F., D'ambrosio, G., Massa, R., Giordano, A., & Bismuto, E. (2005). Electromagnetic fields at mobile phone frequency induce apoptosis and inactivation of the multi-chaperone complex in human epidermoid cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 204(2), 539-548.
22. Chen, Q., Lang, L., Wu, W., Xu, G., Zhang, X., Li, T., & Huang, H. (2013). A meta-analysis on the relationship between exposure to ELF-EMFs and the risk of female breast cancer. *PloS one*, 8(7), e69272.
23. Cleary, S. F. (1993). A review of in vitro studies: low-frequency electromagnetic fields. *The American Industrial Hygiene Association Journal*, 54(4), 178-185.
24. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081.
25. Cos, S., Fern, R., & Mediavilla, M. D. (2003). Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocrine-related cancer*, 10(2), 153-159.
26. Cos, S., Recio, J., & Sanchez-Barcelo, E. J. (1996). Modulation of the length of the cell cycle time of MCF-7 human breast cancer cells by melatonin. *Life sciences*, 58(9), 811-816.

27. Cossarizza, A., Monti, D., Sola, P., Moschini, G., Cadossi, R., Bersani, F., & Franceschi, C. (1989). DNA repair after γ irradiation in lymphocytes exposed to low-frequency pulsed electromagnetic fields. *Radiation research*, 118(1), 161-168.
28. Costa, F. P., de Oliveira, A. C., Meirelles, R., Machado, M. C. C., Zanesco, T., Surjan, R., & Pasche, B. (2011). Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with very low levels of amplitude-modulated electromagnetic fields. *British journal of cancer*, 105(5), 640-648.
29. Cridland, N. A., Haylock, R. G. E., & Saunders, R. D. (1999). 50 Hz magnetic field exposure alters onset of S-phase in normal human fibroblasts. *Bioelectromagnetics*, 20(7), 446-452.
30. Crocetti, S., Beyer, C., Schade, G., Egli, M., Fröhlich, J., & Franco-Obregón, A. (2013). Low intensity and frequency pulsed electromagnetic fields selectively impair breast cancer cell viability. *PloS one*, 8(9), e72944.
31. Cuisnier, O., Serduc, R., Lavieille, J. P., Longuet, M., Reyt, E., & Riva, C. (2003). Chronic hypoxia protects against γ -irradiation-induced apoptosis by inducing bcl-2 up-regulation and inhibiting mitochondrial translocation and conformational change of bax protein. *International journal of oncology*, 23(4), 1033-1041.
32. Czyz, J., Nikolova, T., Schuderer, J., Kuster, N., & Wobus, A. M. (2004). Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells—the role of tumour suppressor p53. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 557(1), 63-74.

33. Danforth, D. N., Tamarkin, L., & Lippman, M. E. (1983). Melatonin increases oestrogen receptor binding activity of human breast cancer cells.
34. De Almodovar, J. R., Nunez, M. I., McMillan, T. J., Olea, N., Mort, C., Villalobos, M., & Steel, G. G. (1994). Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *British journal of cancer*, 69(3), 457.
35. De la Cruz-Morcillo M.A., García-Cano J., Arias-González L., García-Gil E., Artacho-Cordón F., Ríos-Arrabal S., Valero M.L., Cimas F.J., Serrano-Oviedo L., Villas M.V. Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-fluorouracil-associated radiosensitivity. *Cancer Lett.* 2013;335:66–74. [PubMed]
36. De la Cruz-Morcillo, M. A., Valero, M. L. L., Callejas-Valera, J. L., Arias-Gonzalez, L., Melgar-Rojas, P., Galan-Moya, E. M., & Sánchez-Prieto, R. (2011). P38MAPK is a major determinant of the balance between apoptosis and autophagy triggered by 5-fluorouracil: implication in resistance. *Oncogene*, 31(9), 1073-1085.
37. Delle Monache, S., Alessandro, R., Iorio, R., Gualtieri, G., & Colonna, R. (2008). Extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) induce in vitro angiogenesis process in human endothelial cells. *Bioelectromagnetics*, 29(8), 640-648.
38. Delle Monache, S., Angelucci, A., Sanità, P., Iorio, R., Bennato, F., Mancini, F., & Colonna, R. C. (2013). Inhibition of Angiogenesis

Mediated by Extremely Low-Frequency Magnetic Fields (ELF-MFs). *PloS one*, 8(11), e79309.

39. Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., & Grant, S. (2003). MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*, 22(37), 5885-5896.

40. Desai, N. R., Kesari, K. K., & Agarwal, A. (2009). Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*, 7(114), 1-9.

41. Dickinson, S. E., Olson, E. R., Zhang, J., Cooper, S. J., Melton, T., Criswell, P. J., & Bowden, G. T. (2011). p38 MAP kinase plays a functional role in UVB-Induced mouse skin carcinogenesis. *Molecular carcinogenesis*, 50(6), 469-478.

42. Ding, G. R., Nakahara, T., & Miyakoshi, J. (2003). Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis*, 18(5), 439-443.

43. Ding, G. R., Nakahara, T., Tian, F. R., Guo, Y., & Miyakoshi, J. (2001). Transient suppression of X-ray-induced apoptosis by exposure to power frequency magnetic fields in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 286(5), 953-957.

44. Ding, G. R., Yaguchi, H., Yoshida, M., & Miyakoshi, J. (2000). Increase in X-ray-induced mutations by exposure to magnetic field (60 Hz, 5 mT) in NF- κ B-inhibited cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 276(1), 238-243.

45. Dumaz, N., Light, Y., & Marais, R. (2002). Cyclic AMP blocks cell growth through Raf-1-dependent and Raf-1-independent mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 22(11), 3717-3728.
46. El-Deiry, W. S. (2003). The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*, 22(47), 7486-7495.
47. Falone, S., Grossi, M. R., Cinque, B., D'Angelo, B., Tettamanti, E., Cimini, A., & Amicarelli, F. (2007). Fifty hertz extremely low-frequency electromagnetic field causes changes in redox and differentiative status in neuroblastoma cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(11), 2093-2106.
48. Fedorowski, A., & Steciwko, A. (1997). [Biological effects of non-ionizing electromagnetic radiation]. *Medycyna pracy*, 49(1), 93-105.
49. Focke, F., Schuermann, D., Kuster, N., & Schär, P. (2010). DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 683(1), 74-83.
50. Follin-Arbelet, V., Hofgaard, P. O., Hauglin, H., Naderi, S., Sundan, A., Blomhoff, R., & Blomhoff, H. K. (2011). Cyclic AMP induces apoptosis in multiple myeloma cells and inhibits tumor development in a mouse myeloma model. *BMC cancer*, 11(1), 301.
51. Francisco, A. C., Mar, S. A. M. D., Irene, C., Sandra, R. A., Josefa, L., Elisa, R. M., & Isabel, N. M. (2013). Could radiotherapy effectiveness be enhanced by electromagnetic field treatment?. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 14974-14995.

52. Friedman, J., Kraus, S., Hauptman, Y., Schiff, Y., & Seger, R. (2007). Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies. *Biochem. J*, 405, 559-568.
53. Frisch, P., Li, G. C., McLeod, K., & Laramée, C. B. (2013). Induction of heat shock gene expression in RAT1 primary fibroblast cells by ELF electric fields. *Bioelectromagnetics*, 34(5), 405-413.
54. Fröhlich, H. (1968). Bose condensation of strongly excited longitudinal electric modes. *Physics Letters A*, 26(9), 402-403.
55. Fröhlich, H. (1968). Long-range coherence and energy storage in biological systems. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2(5), 641-649.
56. Fröhlich, H. (1969). Quantum mechanical concepts in biology. *Theoretical physics and biology*, 13-22.
57. Fröhlich, H. (1973). Collective behaviour of non-linearly coupled oscillating fields (with applications to biological systems). *J. Collective Phenom*, 1, 101.
58. Fröhlich, H. (1978). Coherent electric vibrations in biological systems and the cancer problem. *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, 26(8), 613-618.
59. Funk, R. H., Monsees, T., & Özkücur, N. (2009). Electromagnetic effects—From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and cytochemistry*, 43(4), 177-264.
60. Galvanovskis, J., & Sandblom, J. (1997). Amplification of electromagnetic signals by ion channels. *Biophysical journal*, 73(6), 3056-3065.

61. Girgert, R., Emons, G., Hanf, V., & Gründker, C. (2009). Exposure of mcf-7 breast cancer cells to electromagnetic fields up-regulates the plasminogen activator system. *International Journal of Gynecological Cancer*, 19(3), 334-338.
62. Girgert, R., Hanf, V., Emons, G., & Gründker, C. (2010). Signal transduction of the melatonin receptor MT1 is disrupted in breast cancer cells by electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 31(3), 237-245.
63. Girgert, R., Schimming, H., Körner, W., Gründker, C., & Hanf, V. (2005). Induction of tamoxifen resistance in breast cancer cells by ELF electromagnetic fields. *Biochemical and biophysical research communications*, 336(4), 1144-1149.
64. Goraca, A., Ciejka, E., & Piechota, A. (2010). Effects of extremely low frequency magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart. *Journal of physiology and pharmacology*, 61(3), 333.
65. Gorczynska, E., & Wegrzynowicz, R. (1991). Structural and functional changes in organelles of liver cells in rats exposed to magnetic fields. *Environmental research*, 55(2), 188-198.
66. Halgamuge, M. N. (2013). Pineal melatonin level disruption in humans due to electromagnetic fields and ICNIRP limits. *Radiation protection dosimetry*, 154(4), 405-416.
67. He, J., Qiu, W., Zhang, Z., Wang, Z., Zhang, X., & He, Y. (2011). Effects of irradiation on growth and differentiation-related gene expression in osteoblasts. *Journal of Craniofacial Surgery*, 22(5), 1635-1640.

68. Hernández, M. D. L. A. R., & Menéndez, M. H. (2001). Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol*, 17(1), 65-71.
69. Hill, S. M., Spriggs, L. L., Simon, M. A., Muraoka, H., & Blask, D. E. (1992). The growth inhibitory action of melatonin on human breast cancer cells is linked to the estrogen response system. *Cancer letters*, 64(3), 249-256.
70. Hintzsche, H., Jastrow, C., Kleine-Ostmann, T., Kärst, U., Schrader, T., & Stopper, H. (2012). Terahertz electromagnetic fields (0.106 THz) do not induce manifest genomic damage in vitro. *PLoS one*, 7(9), e46397.
71. Hogan, M. V., & Wieraszko, A. (2004). An increase in cAMP concentration in mouse hippocampal slices exposed to low-frequency and pulsed magnetic fields. *Neuroscience letters*, 366(1), 43-47.
72. Hong, M. N., Han, N. K., Lee, H. C., Ko, Y. K., Chi, S. G., Lee, Y. S., & Lee, J. S. (2012). Extremely low frequency magnetic fields do not elicit oxidative stress in MCF10A cells. *Journal of radiation research*, 53(1), 79-86.
73. Huber, Stephan Michael, et al. Ionizing radiation, ion transports and radioresistance of cancer cells. *Frontiers in Physiology*, vol. 1, p. 0.2013
74. Hynes, J., Floyd, S., Soini, A. E., O'Connor, R., & Papkovsky, D. B. (2003). Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. *Journal of biomolecular screening*, 8(3), 264-272.

75. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-ionizing radiation, part 1: Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks to Hum. 2002;80:1–395. [PubMed]
76. Irmak, M. K., Fadilloğlu, E., Güleç, M., Erdoğan, H., Yağmurca, M., & Akyol, Ö. (2002). Effects of electromagnetic radiation from a cellular telephone on the oxidant and antioxidant levels in rabbits. *Cell biochemistry and function*, 20(4), 279-283.
77. Ivancsits, S., Diem, E., Pilger, A., Rüdiger, H. W., & Jahn, O. (2002). Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutation Research/Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1), 1-13.
78. Jeggo, P. A. (2009). Risks from low dose/dose rate radiation: what an understanding of DNA damage response mechanisms can tell us. *Health physics*, 97(5), 416-425.
79. Jian, W., Wei, Z., Zhiqiang, C., & Zheng, F. (2009). X-ray-induced apoptosis of BEL-7402 cell line enhanced by extremely low frequency electromagnetic field in vitro. *Bioelectromagnetics*, 30(2), 163-165.
80. Jin, M., Blank, M., & Goodman, R. (2000). ERK1/2 phosphorylation, induced by electromagnetic fields, diminishes during neoplastic transformation. *Journal of cellular biochemistry*, 78(3), 371-379.
81. Jin, Y. B., Kang, G. Y., Lee, J. S., Choi, J. I., Lee, J. W., Hong, S. C., & Lee, Y. S. (2012). Effects on micronuclei formation of 60-Hz

electromagnetic field exposure with ionizing radiation, hydrogen peroxide, or c-Myc overexpression. *International journal of radiation biology*, 88(4), 374-380.

82. Joiner M., van der Kogel A. *Basic Clinical Radiobiology*. 4th ed. Vol. 1. Hodder Arnold; London, UK: 2009. pp. 41–55.
83. Joiner, Michael; Van Der Kogel, A. J. (ed.). *Basic clinical radiobiology*. CRC Press, 2009.p.1-27
84. Kempner, E. S. (1988). Molecular size determination of enzymes by radiation inactivation. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Volume 61, 107-147.
85. Khaja, Azharuddin Sajid Syed, et al. Cyclin A1 Modulates the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Hormone-Dependent Growth and Angiogenesis of Breast Cancer. *PloS one*, 2013, vol. 8, no 8, p. e72210.
86. Kim, B. C., Han, N. K., Byun, H. O., Kim, S. S., Ahn, E. K., Chu, I. S., ... & Lee, J. S. (2010). Time-dependently expressed markers and the characterization for premature senescence induced by ionizing radiation in MCF7. *Oncology reports*, 24(2), 395.
87. Kim, J., Ha, C. S., Lee, H. J., & Song, K. (2010). Repetitive exposure to a 60-Hz time-varying magnetic field induces DNA double-strand breaks and apoptosis in human cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 400(4), 739-744.
88. Kirson, E. D., Dbalý, V., Tovaryš, F., Vymazal, J., Soustiel, J. F., Itzhaki, A., & Palti, Y. (2007). Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(24), 10152-10157.

89. Kirson, E. D., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Dekel, E., Itzhaki, A., Wasserman, Y., & Palti, Y. (2004). Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer research*, 64(9), 3288-3295.

90. Koh, E. K., Ryu, B. K., Jeong, D. Y., Bang, I. S., Nam, M. H., & Chae, K. S. (2008). A 60-Hz sinusoidal magnetic field induces apoptosis of prostate cancer cells through reactive oxygen species. *International journal of radiation biology*, 84(11), 945-955.

91. Kovacic, P., & Somanathan, R. (2010). Electromagnetic fields: mechanism, cell signaling, other bioprocesses, toxicity, radicals, antioxidants and beneficial effects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 30(4), 214-226.

92. Koyama, S., Nakahara, T., Sakurai, T., Komatsubara, Y., Isozumi, Y., & Miyakoshi, J. (2005). Combined exposure of ELF magnetic fields and X-rays increased mutant yields compared with X-rays alone in pTN89 plasmids. *Journal of radiation research*, 46(2), 257-264.

93. LAGROYE and JL PONCY, I. (1997). The effect of 50 Hz electromagnetic fields on the formation of micronuclei in rodent cell lines exposed to gamma radiation. *International journal of radiation biology*, 72(2), 249-254.

94. Lai, H., & Singh, N. P. (2004). Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat. *Environmental health perspectives*, 112(6), 687.

95. Lange, S., Richard, D., Viergutz, T., Kriehuber, R., Weiss, D. G., & Simkó, M. (2002). Alterations in the cell cycle and in the protein level of cyclin D1, p21CIP1, and p16INK4a after exposure to 50 Hz MF in human cells. *Radiation and environmental biophysics*, 41(2), 131-137.
96. Lange, S., Viergutz, T., & Simko, M. (2004). Modifications in cell cycle kinetics and in expression of G1 phase-regulating proteins in human amniotic cells after exposure to electromagnetic fields and ionizing radiation. *Cell proliferation*, 37(5), 337-349.
97. Lee, H. J., Jin, Y. B., Lee, J. S., Choi, J. I., Lee, J. W., Myung, S. H., & Lee, Y. S. (2012). Combined effects of 60 Hz electromagnetic field exposure with various stress factors on cellular transformation in NIH3T3 cells. *Bioelectromagnetics*, 33(3), 207-214.
98. Li, D. L., Wei, L., Wen, X. M., Song, H., Li, Q., Lv, J. W., & Zhang, J. W. (2014). The Effects of X-Ray Irradiation on the Proliferation and Apoptosis of MCF-7 Breast Cancer Cells. *Ultrastructural pathology*, 38(3), 211-216.
99. Li, H., Zeng, Q., Weng, Y., Lu, D., Jiang, H., & Xu, Z. (2005). Effects of ELF magnetic fields on protein expression profile of human breast cancer cell MCF7. *Science in China Series C: Life Sciences*, 48(5), 506-514.
100. Liburdy, R. P., Sloma, T. R., Sokolic, R., & Yaswen, P. (1993). ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER+ breast cancer cell proliferation. *Journal of Pineal Research*, 14(2), 89-97.

101. Lin, H., Han, L., Blank, M., Head, M., & Goodman, R. (1998). Magnetic field activation of protein–DNA binding. *Journal of cellular biochemistry*, 70(3), 297-303.
102. Linet, M. S., Hatch, E. E., Kleinerman, R. A., Robison, L. L., Kaune, W. T., Friedman, D. R., ... & Tarone, R. E. (1997). Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. *New England journal of medicine*, 337(1), 1-8.
103. Loberg, L. I., Engdahl, W. R., Gauger, J. R., & McCormick, D. L. (2009). Cell viability and growth in a battery of human breast cancer cell lines exposed to 60 Hz magnetic fields.
104. Löscher, W., & Mevissen, M. (1994). Animal studies on the role of 50/60-Hertz magnetic fields in carcinogenesis. *Life sciences*, 54(21), 1531-1543.
105. Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., & Galli, F. (2010). Melatonin signaling and cell protection function. *The FASEB Journal*, 24(10), 3603-3624.
106. Ma, Q., Deng, P., Zhu, G., Liu, C., Zhang, L., Zhou, Z., ... & Zhang, Y. (2014). Extremely Low-Frequency Electromagnetic Fields Affect Transcript Levels of Neuronal Differentiation-Related Genes in Embryonic Neural Stem Cells. *PloS one*, 9(3), e90041.
107. Maes, A., Collier, M., Vandoninck, S., Scarpa, P., & Verschaeve, L. (2000). Cytogenetic effects of 50 Hz magnetic fields of different magnetic flux densities. *Bioelectromagnetics*, 21(8), 589-596.
108. Mairs, R. J., Hughes, K., Fitzsimmons, S., Prise, K. M., Livingstone, A., Wilson, L., & Boyd, M. (2007). Microsatellite analysis for

determination of the mutagenicity of extremely low-frequency electromagnetic fields and ionising radiation< i> in vitro</i>. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1), 34-41.

109. Malmivuo, J., & Plonsey, R. (1995). *Bioelectromagnetism: principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*. Oxford University Press.

110. Manikonda, P. K., Rajendra, P., Devendranath, D., Gunasekaran, B., Sashidhar, R. B., & Subramanyam, C. (2007). Influence of extremely low frequency magnetic fields on Ca²⁺ signaling and NMDA receptor functions in rat hippocampus. *Neuroscience letters*, 413(2), 145-149.

111. Mannerling, A. C., Simkó, M., Mild, K. H., & Mattsson, M. O. (2010). Effects of 50-Hz magnetic field exposure on superoxide radical anion formation and HSP70 induction in human K562 cells. *Radiation and environmental biophysics*, 49(4), 731-741.

112. Manti, L., & D'Arco, A. (2010). Cooperative biological effects between ionizing radiation and other physical and chemical agents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 704(1), 115-122.

113. Marcantonio, P., Del Re, B., Franceschini, A., Capri, M., Lukas, S., Bersani, F., & Giorgi, G. (2010). Synergic effect of retinoic acid and extremely low frequency magnetic field exposure on human neuroblastoma cell line BE (2) C. *Bioelectromagnetics*, 31(6), 425-433.

114. Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370.

115. Martínez, M. A., Úbeda, A., Cid, M. A., & Trillo, M. A. (2012). The proliferative response of NB69 human neuroblastoma cells to a 50 Hz magnetic field is mediated by ERK1/2 signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29(5-6), 675-686.
116. McCann, J., Dietrich, F., & Rafferty, C. (1998). The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 411(1), 45-86.
117. Mediavilla, M. D., Cos, S., & Sanchez-Barcelo, E. J. (1999). Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Life sciences*, 65(4), 415-420.
118. Mediavilla, M., J Sanchez-Barcelo, E., X Tan, D., Manchester, L., & J Reiter, R. (2010). Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Current medicinal chemistry*, 17(36), 4462-4481.
119. Mercado-Sáenz, S., Ruiz-Gómez, M. J., López-Díaz, B., Sendra-Portero, F., & Martínez-Morillo, M. Magnetic Fields might be Used as Radiosensitizer for Cancer Radiation Therapy.
120. Miyakoshi, J., Koji, Y., Wakasa, T., & Takebe, H. (1999). Long-term exposure to a magnetic field (5 mT at 60 Hz) increases X-ray-induced mutations. *Journal of radiation research*, 40(1), 13-21.
121. Nie, K., & Henderson, A. (2003). MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz electromagnetic field. *Journal of cellular biochemistry*, 90(6), 1197-1206.
122. Nikolova, T., Czyz, J., Rolletschek, A., Blyszczuk, P., Fuchs, J., Jovtchev, G., ... & Wobus, A. M. (2005). Electromagnetic fields affect

- transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *The FASEB journal*, 19(12), 1686-1688.
123. Nuñez, M. I., McMillan, T. J., Valenzuela, M. T., de Almodovar, J. M., & Pedraza, V. (1996). Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells. *Radiotherapy and oncology*, 39(2), 155-165.
124. O'Mullane, M. J., & Baker, M. S. (1999). Elevated plasminogen receptor expression occurs as a degradative phase event in cellular apoptosis. *Immunology and cell biology*, 77(3), 249-255.
125. Palme, D., Misovic, M., Schmid, E., Klumpp, D., Salih, H. R., Rudner, J., & Huber, S. M. (2013). Kv3.4 potassium channel-mediated electrosignaling controls cell cycle and survival of irradiated leukemia cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 465(8), 1209-1221.
126. Patruno, A., Pesce, M., Marrone, A., Speranza, L., Grilli, A., De Lutiis, M. A., & Reale, M. (2012). Activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and the tissue inhibitor of MMP (TIMP)-1 in electromagnetic field-exposed THP-1 cells. *Journal of cellular physiology*, 227(6), 2767-2774.
127. Pilla, A., Fitzsimmons, R., Muehsam, D., Wu, J., Rohde, C., & Casper, D. (2011). Electromagnetic fields as first messenger in biological signaling: Application to calmodulin-dependent signaling in tissue repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(12), 1236-1245.

128. Pokorný, J. (2012). Physical aspects of biological activity and cancer. *AIP Advances*, 2(1), 011207.
129. Reubold, T. F., & Eschenburg, S. (2012). A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cellular signalling*, 24(7), 1420-1425.
130. Ríos-Arrabal, S., Artacho-Cordón, F., León, J., Román-Marinetto, E., del Mar Salinas-Asensio, M., Calvente, I., & Núñez, M. I. (2013). Involvement of free radicals in breast cancer. *SpringerPlus*, 2, 404.
131. Rocha, A. S., Paternot, S., Coulonval, K., Dumont, J. E., Soares, P., & Roger, P. P. (2008). Cyclic AMP inhibits the proliferation of thyroid carcinoma cell lines through regulation of CDK4 phosphorylation. *Molecular biology of the cell*, 19(11), 4814-4825.
132. Rubik, B., Becker, P. R. O., Flower, R. G., Hazlewood, C. F., Liboff, A. R., & Walleczek, J. Aplicaciones del Bioelectromagnetismo en Medicina.
133. Rubin, G. J., Nieto-Hernandez, R., & Wessely, S. (2010). Idiopathic environmental intolerance attributed to electromagnetic fields (formerly 'electromagnetic hypersensitivity'): an updated systematic review of provocation studies. *Bioelectromagnetics*, 31(1), 1-11.
134. Ruiz Gomez, M. J., De la Pena, L., Pastor, J. M., Martínez Morillo, M., & Gil, L. (2001). 25 Hz electromagnetic field exposure has no effect on cell cycle distribution and apoptosis in U-937 and HCA-2/1< sup>cch</sup> cells. *Bioelectrochemistry*, 53(1), 137-140.

135. Ruiz-Gómez, M. J., & Martínez-Morillo, M. (2009). Electromagnetic fields and the induction of DNA strand breaks. *Electromagnetic biology and medicine*, 28(2), 201-214.
136. Ruiz-Gómez, M. J., Prieto-Barcia, M. I., Ristori-Bogajo, E., & Martínez-Morillo, M. (2004). Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioelectrochemistry*, 64(2), 151-155.
137. Ruiz-Gómez, M. J., Ristori-Bogajo, E., Prieto-Barcia, M. I., & Martínez-Morillo, M. (2010). No evidence of cellular alterations by milliTesla-level static and 50 Hz magnetic fields on *S. cerevisiae*. *Electromagnetic biology and medicine*, 29(4), 154-164.
138. Ruiz-Gómez, M. J., Sendra-Portero, F., & Martínez-Morillo, M. (2010). Effect of 2.45 mT sinusoidal 50 Hz magnetic field on *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in DNA strand breaks repair. *International journal of radiation biology*, 86(7), 602-611.
139. Sadeghipour, R., Ahmadian, S., Bolouri, B., Pazhang, Y., & Shafieezadeh, M. (2012). Effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic fields on morphological and biochemical properties of human breast carcinoma cells (T47D). *Electromagnetic biology and medicine*, 31(4), 425-435.
140. Saenko, Y., Cieslar-Pobuda, A., Skonieczna, M., & Rzeszowska-Wolny, J. (2013). Changes of reactive oxygen and nitrogen species and mitochondrial functioning in human K562 and HL60 cells exposed to ionizing radiation. *Radiation research*, 180(4), 360-366.

141. Salvatore, J. R., Blackinton, D., Polk, C., & Mehta, S. (1994). Non-ionizing electromagnetic radiation: a study of carcinogenic and cancer treatment potential. *Reviews on environmental health*, 10(3-4), 197-208.
142. Sánchez-Barceló, E. J., Cos, S., Mediavilla, D., Martínez-Campa, C., González, A., & Alonso-González, C. (2005). Melatonin–estrogen interactions in breast cancer. *Journal of pineal research*, 38(4), 217-222.
143. Santoro, N., Lisi, A., Pozzi, D., Pasquali, E., Serafino, A., & Grimaldi, S. (1997). Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1357(3), 281-290.
144. Schimmelpfeng, J., Stein, J. C., & Dertinger, H. (1995). Action of 50 Hz magnetic fields on cyclic AMP and intercellular communication in monolayers and spheroids of mammalian cells. *Bioelectromagnetics*, 16(6), 381-386.
145. Schreier, N., Huss, A., & Rösli, M. (2006). The prevalence of symptoms attributed to electromagnetic field exposure: a cross-sectional representative survey in Switzerland. *Sozial-und Präventivmedizin*, 51(4), 202-209.
146. Sergeev, I. N., & Rhoten, W. B. (1998). Regulation of intracellular calcium in human breast cancer cells. *Endocrine*, 9(3), 321-327
147. Siles, E., Villalobos, M., Valenzuela, M. T., Nunez, M. I., Gordon, A., McMillan, T. J., & De Almodóvar, J. R. (1996). Relationship between

p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *British journal of cancer*, 73(5), 581.

148. Simkó, M. (2004). Induction of cell activation processes by low frequency electromagnetic fields. *The Scientific World Journal*, 4, 4-22.

149. Simko, M. (2007). Cell type specific redox status is responsible for diverse electromagnetic field effects. *Current Medicinal Chemistry*, 14(10), 1141-1152.

150. Simkó, M., & Mattsson, M. O. (2004). Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation. *Journal of cellular biochemistry*, 93(1), 83-92.

151. Simkó, M., Droste, S., Kriehuber, R., & Weiss, D. G. (2001). Stimulation of phagocytosis and free radical production in murine macrophages by 50 Hz electromagnetic fields. *European Journal of Cell Biology*, 80(8), 562-566.

152. Simko, M., Kriehuber, R., Weiss, D. G., & Luben, R. A. (1998). Effects of 50 Hz EMF exposure on micronucleus formation and apoptosis in transformed and nontransformed human cell lines. *Bioelectromagnetics*, 19(2), 85-91.

153. Strauch, B., Herman, C., Dabb, R., Ignarro, L. J., & Pilla, A. A. (2009). Evidence-based use of pulsed electromagnetic field therapy in clinical plastic surgery. *Aesthetic Surgery Journal*, 29(2), 135-143.

154. Stronati, L., Testa, A., Villani, P., Marino, C., Lovisolo, G. A., Conti, D., ... & Cordelli, E. (2004). Absence of genotoxicity in human blood cells exposed to 50 Hz magnetic fields as assessed by comet assay,

chromosome aberration, micronucleus, and sister chromatid exchange analyses. *Bioelectromagnetics*, 25(1), 41-48.

155. Supino, R., Bottone, M. G., Pellicciari, C., Caserini, C., Bottiroli, G., Belleri, M., & Veicsteinas, A. (2001). Sinusoidal 50 Hz magnetic fields do not affect structural morphology and proliferation of human cells in vitro.

156. Tatarov, I., Panda, A., Petkov, D., Kolappaswamy, K., Thompson, K., Kavirayani, A., & DeTolla, L. J. (2011). Effect of magnetic fields on tumor growth and viability. *Comparative medicine*, 61(4), 339.

157. Tian, F., Nakahara, T., Yoshida, M., Honda, N., Hirose, H., & Miyakoshi, J. (2002). Exposure to power frequency magnetic fields suppresses X-ray-induced apoptosis transiently in Ku80-deficient xrs5 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), 355-361.

158. Tofani, S., Barone, D., Cintonino, M., de Santi, M. M., Ferrara, A., Orlassino, R., & Ronchetto, F. (2001). Static and ELF magnetic fields induce tumor growth inhibition and apoptosis. *Bioelectromagnetics*, 22(6), 419-428.

159. Toro, J. R. (1996). *Electroterapia y electrodiagnóstico* Universidad de Valladolid. 299-309

160. Touitou, Y., Bogdan, A., Lambrozo, J., & Selmaoui, B. (2006). Is melatonin the hormonal missing link between magnetic field effects and human diseases?. *Cancer Causes & Control*, 17(4), 547-552.

161. Touitou, Y., Lambrozo, J., Camus, F., & Charbuy, H. (2003). Magnetic fields and the melatonin hypothesis: a study of workers

chronically exposed to 50-Hz magnetic fields. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(6), R1529-R1535.

162. Vizcaino, V. (2003). Biological effects of low frequency electromagnetic fields. *Radiobiology*, 3, 44-46.

163. Wang, X., McGowan, C. H., Zhao, M., He, L., Downey, J. S., Fearn, C., & Han, J. (2000). Involvement of the MKK6-p38 γ cascade in γ -radiation-induced cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology*, 20(13), 4543-4552.

164. Wang, Y., Liu, L., & Zhou, D. (2011). Inhibition of p38 MAPK attenuates ionizing radiation-induced hematopoietic cell senescence and residual bone marrow injury. *Radiation research*, 176(6), 743-752.

165. Wen, J., Jiang, S., & Chen, B. (2011). The effect of 100 Hz magnetic field combined with X-ray on hepatoma-implanted mice. *Bioelectromagnetics*, 32(4), 322-324.

166. Winker, R., Ivancsits, S., Pilger, A., Adlkofer, F., & Rüdiger, H. W. (2005). Chromosomal damage in human diploid fibroblasts by intermittent exposure to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1), 43-49.

167. Wolf, F. I., Torsello, A., Tedesco, B., Fasanella, S., Boninsegna, A., D'Ascenzo, M., & Cittadini, A. (2005). 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1743(1), 120-129.

168. Wood, C. D., Thornton, T. M., Sabio, G., Davis, R. A., & Rincon, M. (2009). Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *International journal of biological sciences*, 5(5), 428.
169. Yamaguchi, T., Wallace, D. P., Magenheimer, B. S., Hempson, S. J., Grantham, J. J., & Calvet, J. P. (2004). Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39), 40419-40430.
170. Yamamori, T., Yasui, H., Yamazumi, M., Wada, Y., Nakamura, Y., Nakamura, H., & Inanami, O. (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(2), 260-270.
171. Yoon, H. E., Lee, J. S., Myung, S. H., & Lee, Y. S. (2014). Increased γ -H2AX by exposure to a 60-Hz magnetic fields combined with ionizing radiation, but not hydrogen peroxide, in non-tumorigenic human cell lines. *International journal of radiation biology*, 90(4), 291-298.
172. Yoshizawa, H., Tsuchiya, T., Mizoe, H., Ozeki, H., Kanao, S., Yomori, H., & Otaka, Y. (2002). No effect of extremely low-frequency magnetic field observed on cell growth or initial response of cell proliferation in human cancer cell lines. *Bioelectromagnetics*, 23(5), 355-368.
173. Zimmerman, J. W., Pennison, M. J., Brezovich, I., Yi, N., Yang, C. T., Ramaker, R., & Pasche, B. (2011). Cancer cell proliferation is

inhibited by specific modulation frequencies. *British journal of cancer*, 106(2), 307-313.

174. Zmyślony, M., Politanski, P., Rajkowska, E., Szymczak, W., & Jajte, J. (2004). Acute exposure to 930 MHz CW electromagnetic radiation in vitro affects reactive oxygen species level in rat lymphocytes treated by iron ions. *Bioelectromagnetics*, 25(5), 324-328.