



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE CAMPOS  
MAGNÉTICOS DE DIFERENTES FRECUENCIAS  
SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS  
CANCERÍGENAS MCF-7

### T É S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

### B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

**PAULINA ALEJANDRA FLORES DE LOS RIOS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. CÉSAR ANTONIO GONZÁLEZ  
DÍAZ

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

México, Diciembre 2010.





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*□Haz sólo aquello que sea agradable, agradable a ti y a tu entorno. Haz sólo aquello que te traiga una canción y cree un ritmo de celebración a tu alrededor La oración verdadera es sólo una, y es de modo que empieces a sentirte agradecido con la existencia. La existencia te ha dado tan gran oportunidad que nunca pediste, que nunca mereciste, y sin embargo la has obtenido. Y has florecido con miles de flores. Y dejas al mundo con la fragancia de la gratitud.□*

Osho

**En memoria de mis abuelos: Alberto De los Rios Pizarro, Graciela Yolanda Campos Martínez, Sam Fung- Canton y María Luisa González.**

Dedico este triunfo a las personas que en todo momento me brindaron sentimientos, vivencias y valores auténticos para culminar esta etapa de mi vida.

No hay palabras para describir el más profundo amor y respeto a mis padres que en todo momento han estado a mi lado:

A mi Madre, Graciela Guadalupe De los Rios Campos, por ser mi fiel amiga, por su infinito amor. Gracias por ser parte de mis desvelos, por comprender mis ideales y por fomentarme el deseo de ser un mejor ser humano; por darme la fuerza para abrir las puertas ante mi inquietud de ser Biólogo, por enseñarme a cumplir mis sueños y por creer en mí.

A mi Padre, Martín Flores González, por su ejemplo de fortaleza ante cualquier circunstancia, por forjarme como una mujer fuerte y por cuidarme y velar por mí aún en la distancia. Gracias papá por mostrarme la verdadera nobleza que posees en ti y por ser parte de este gran momento.

A mi hermana, Gabriela Angelina Lazcano De los Rios, por el ejemplo de espíritu fuerte y seguro que llevas en ti, por esa madurez que siempre te ha caracterizado y por ser la dueña de mis enojos y sonrisas, gracias por enseñarme a caer y levantarme. Este triunfo lo comparto contigo.

A mis tías, por esas palabras que dejaron huella en mí, por la valentía de vivir y sobreponerse ante cualquier circunstancia. Gracias por mostrarme el coraje de sumergirme en el mundo y cambiar las cosas malas y tristes.

A mis primos, por esos desvelos con miles de sonrisas y largas charlas. Comparto este logro con ustedes con mucho cariño y también lo dedico a la nueva llegada de seres a nuestra familia: Regina y Mateo.

A mis amigos: Ángel, Maritza, Martha, Andrés, Yahir, Carlos, Daniel, Luz Rita y Estefani por su gran amistad a lo largo de este camino. Gracias por su alegría, consejos e interés por mi vida profesional y personal, por robarme sonrisas y escucharme en momentos alegres y tristes.

A la Biól. Asela Del Carmen Varela, por esas palabras que siempre llevaré en mi vida, por creer en mí como estudiante y por darme a conocer la pasión de una de las áreas poco estudiadas de la Biología: la Oceanografía.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda por sus valiosos conocimientos y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Ma. De Jesús Laura Castañeda Partida por entregarme a lo largo de la carrera su amistad incondicional, por ese ejemplo de ser una gran mujer y por la revisión minuciosa de esta tesis.

A la Dra. Marta Ofelia Salcedo Álvarez y al Dr. Ramón Víctor Moreno Torres por su interés mostrado y colaboración a este proyecto.

A los Profesores de la FES Iztacala que a lo largo de la carrera tuve el placer y la dicha de que me proporcionaran las herramientas para cumplir mi sueño de ser Biólogo. Gracias por coadyuvar con su sabiduría a lo largo de mis metas.

Mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que no están escritos sus nombres pero que cada uno dejó en mi granitos de experiencias, consejos y vivencias, sin las cuales no hubiese llegado este día.

Y en especial a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas como mi segunda casa y ayudarme a realizar este anhelo. Dedicada a la Máxima Casa de Estudios con profundo respeto, agradecimiento y cariño que merece tan prestigiada institución.

**□POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU□**

Agradecimientos por el desarrollo a la realización del presente:

Secretaría de la Defensa Nacional

Universidad del Ejército y Fuerza Aérea Mexicana

Escuela Militar de Graduados de Sanidad

Este trabajo fue apoyado por el "Programa de Capacitación y Sensibilización para Efectivos en Materia de Equidad y Perspectiva de Género" del EMDN- SEDENA.

Tte. Cor. Salvador Martín Polo Soto

Dr. César Antonio González Díaz

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1.- CÁNCER	3
1.1.1.- Cáncer y procesos de desarrollo	3
1.2.- ANATOMÍA DE LA REGIÓN MAMARIA	5
1.2.1.- Cáncer de seno	5
1.2.2.- Mutaciones genéticas: tres genes principales en el cáncer de seno	7
1.2.3.- Cáncer de seno en hombres	8
1.3.- LÍNEA CELULAR MCF-7	9
1.4.- EL CAMPO MAGNÉTICO (CM)	9
1.4.1.- Efectos de los CM en los sistemas vivos	10
1.4.2.- Dispersión y cambios celulares	12
<b>2.- ANTECEDENTES</b>	15
Ciclo celular	15
Bomba Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup>	28
2.1.- ANTECEDENTES GENERALES	35
2.2.- ANTECEDENTES PARA LA LÍNEA CELULAR CANCERÍGENA MCF-7	38
<b>3.- JUSTIFICACIÓN</b>	42
<b>4.- OBJETIVOS</b>	43
<b>5.- HIPÓTESIS</b>	43
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	44
<b>6.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	45
6.1.- MATERIAL	45

6.2.- MÉTODOS	45
6.2.1.- Cultivo celular	45
6.2.2.- Inducción de CM no ionizantes a diferentes frecuencias	46
6.2.3.- Condiciones basales:	
a) Confluencia	46
b) Viabilidad	46
6.2.4.- Condiciones finales:	
a) Confluencia	47
b) Viabilidad	47
6.2.5.- Análisis estadístico	47
<b>7.- RESULTADOS</b>	<b>47</b>
7.1 Confluencia	49
7.2 Viabilidad	57
<b>8.- DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
8.1.- Confluencia	60
8.2.- Viabilidad	61
<b>9.- CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
9.1.- Confluencia	63
9.2.- Viabilidad	63
<b>10.- ANEXOS</b>	<b>64</b>
10.1.- ANEXO DE MATERIAL	64
10.2.- ANEXO DE SOLUCIONES	65
10.3.- ANEXO DE PROCEDIMIENTOS	67
10.4.- ANEXO DE EQUIPOS	68
<b>11.- INDICE DE TABLAS</b>	<b>72</b>
<b>13.- INDICE DE FIGURAS</b>	<b>73</b>



<b>BIBLIOGRAFIA</b>	76
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS</b>	78

## **RESUMEN**

Estudios epidemiológicos han asociado la exposición a Campos Magnéticos (CMs) de baja frecuencia en el rango de dispersión  $\alpha$  ( con una alta incidencia de cáncer y a un aceleramiento significativo en el crecimiento de células cancerígenas. En contraste, otros reportes indican que CMs de alta frecuencia dentro del rango de dispersión beta ( $\beta$ ) reducen la concentración de células malignas. La gran variabilidad de resultados encontrados sugiere enfocar la atención en el efecto que las frecuencias de CMs pueden tener sobre la viabilidad de células cancerígenas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad de células cancerígenas como una función de la frecuencia de CMs inducidos. Se sometieron cultivos de la línea celular cancerígena MCF-7 durante 24 horas a la influencia de CMs de frecuencias dentro de los rangos de dispersión  $\alpha$  (0.1, 1, 10 y 100 KHz) y  $\beta$  (1 y 10 MHz). Se estimó la confluencia en el campo óptico y se calculó la tasa de viabilidad mediante la técnica de azul tripano, los hallazgos se compararon con la confluencia y viabilidad de cultivos control (sin exposición a CMs). Los resultados indicaron que la viabilidad de cultivos celulares expuestos a CMs de 1 KHz disminuyó, mientras que los expuestos a 1 MHz aumentó con respecto a los casos control. El efecto observado de CMs en el rango de dispersión  $\alpha$  (1KHz) sugieren un desequilibrio del potencial de membrana y el ciclo celular, mientras que en el rango de dispersión  $\beta$  (1MHz), los CMs parecen tener un efecto protector en la viabilidad de dichas células; sin embargo, aún se requieren estudios adicionales que permitan dilucidar con certeza los mecanismos involucrados en tales efectos.

Palabras clave: *Campos Magnéticos, Viabilidad Celular, MCF-7.*

## **ABSTRACT**

Epidemiological studies have linked exposure to low frequency Magnetic Fields (MFs) in the range of alpha dispersion ( $\alpha$ ) with a high incidence of cancer and significant acceleration in the growth of cancer cells. In contrast, other reports indicate that high- frequency MFs in the range of beta ( $\beta$  dispersion reduces the concentration of malignant cells. The great variability of results found suggest focusing attention on the effect of frequency MFs can have on the viability of cancer cells. The aim of this study was to assess the viability of cancer cells as a function of the frequency of induced MFs. Cultures underwent cancer cell line MCF-7 for 24 hours at the influence of MFs of frequencies within the range of  $\alpha$  (0.1, 1, 10 y 100 KHz) and  $\beta$  dispersion (1 y 10 MHz) . Confluence was estimated in the optical field and calculated the rate of viability by the trypan blue technique, the findings were compared with the confluence and viability of control cultures (without exposure to MFs). The results indicated that the viability of cell cultures exposed to MFs of 1 KHz decreased, while those exposed to 1 MHz increased compared with control cases. The observed effect of MFs in the range of  $\alpha$  dispersion (1 KHz) suggest an imbalance in membrane potential and cell cycle, while in the  $\beta$  dispersion range (1 MHz), MFs seem to have a protective effect in viability of these cells; however still required further studies to precisely elucidate the mechanisms involved in such effects.

Key words: *Magnetic Fields, Cellular viability, MCF-7.*

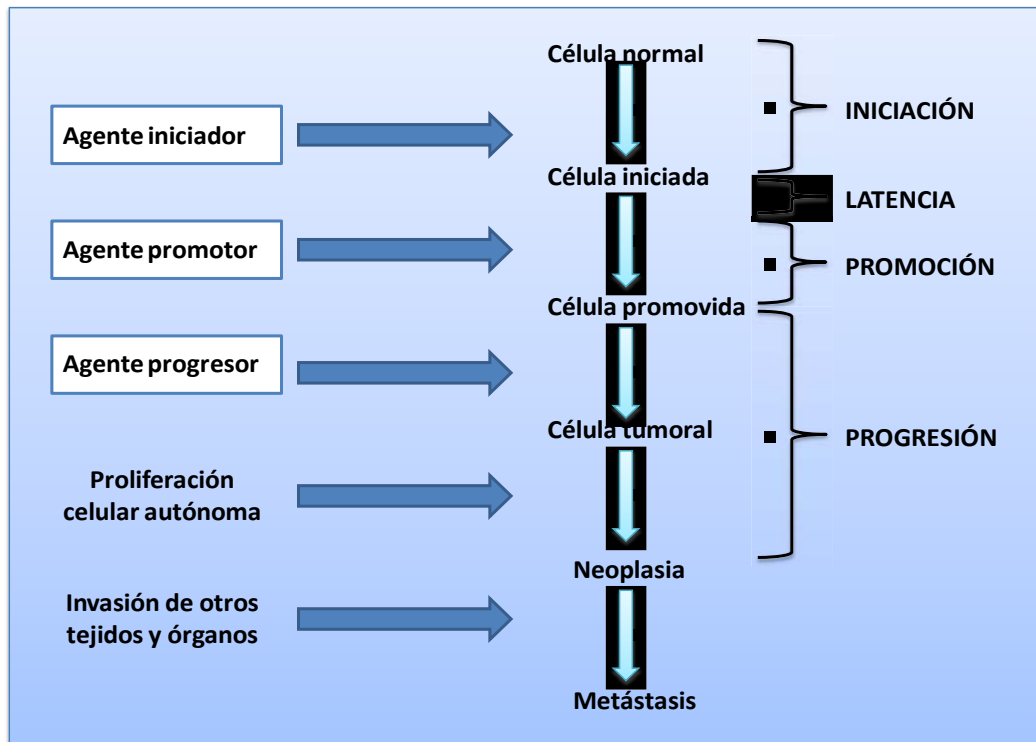
## **1.-INTRODUCCIÓN**

### **1.1.-CÁNCER**

#### **1.1.1.-Cáncer y procesos de desarrollo**

El cáncer, sinónimo de carcinoma, se aplica a neoplasias malignas que se originan en estirpes celulares de origen epitelial o glandular y no a las que son generadas por células de estirpe mesenquimal. Anteriormente conocida como “enfermedad del cangrejo” por el modo como este mal deriva al organismo humano en forma avanzada, el cáncer es una enfermedad genética que determina la anormalidad del ciclo celular y, por lo tanto, se expresa en algún o algunos tejidos y órganos. Hoy sabemos que el cáncer es una enfermedad potencialmente letal y, que va en aumento dentro de las sociedades del siglo XXI [1].

El proceso de carcinogenicidad (*Fig.1*) es complejo y reconoce básicamente dos orígenes: genético, cuando la alteración se produce sobre el DNA (Ácido Desoxirribonucleico), o epigenético, si las modificaciones fueron sufridas por otras moléculas diferentes al DNA (por ejemplo, el huso mitótico que se forma durante la división celular). Cuando la etiología es el daño genético, el proceso de desarrollo de cáncer tiene cuatro etapas: 1) periodo de inducción: el DNA de una célula normal puede ser dañado por agentes físicos o químicos, 2) periodo de latencia: en el cual el grupo de células modificadas por el periodo de inducción, permanece inactivo a la espera de condiciones más favorables; este periodo de latencia puede durar varios años, 3) periodo de promoción: la promoción puede ocurrir espontáneamente por agentes endógenos o por agentes promotores físicos o químicos, y 4) periodo de progresión: el agente progresor es capaz de convertir una célula iniciada o en estado de promoción en una célula potencialmente cancerígena [2].



**Figura 1.** Proceso de Carcinogenicidad. Los dos orígenes por los que puede desarrollarse cáncer: genético y epigenético (Tomada de García, 2005 [2]).

Cuando el origen es epigenético los agentes carcinógenos no modifican directamente el DNA, aparentemente actúan a través de la modulación del crecimiento y la muerte celular. En general, estos compuestos actúan modificando la fisiología normal de órganos y sistemas específicos produciéndose una sobreestimulación persistente cuyo resultado es una replicación celular intensificada. La acción carcinógena de los compuestos epigenéticos puede tener diferentes mecanismos pero todos ellos comparten las siguientes características principales:

- **Especificidad:** los agentes epigenéticos, al contrario que los genotóxicos, pueden ser más específicos en su capacidad de inducir carcinogénesis ya que frecuentemente inducen la formación de tumores en una especie animal, un sexo determinado y en la mayor parte de los casos en uno o varios órganos determinados dentro de una especie. Esta especificidad puede ser explicada por diferencias fisiológicas, metabólicas y de sensibilidad interespecífica.

- Existencia de un umbral del tumor: en la mayoría de los casos el efecto carcinógeno se produce solamente cuando la exposición ocurre a altas dosis de los compuestos por lo que la carcinogénesis no aparecerá hasta que se alcance un determinado umbral. Según estos datos, se pueden construir curvas de dosis- respuesta para correlacionar qué dosis son perjudiciales. El análisis de estas curvas son de especial utilidad para determinar a qué niveles de un compuesto específico no se produce efecto adverso y cuales constituyen factores de riesgo para el desarrollo de tumor en humanos.
- Reversibilidad: los carcinógenos epigenéticos actúan generalmente como promotores del tumor cuando son administrados continua y prolongadamente. Los efectos producidos pueden revertir parcialmente cuando se interrumpe la administración del compuesto.
- Citotoxicidad: los agentes epigenéticos son citotóxicos, producen un perjuicio crónico en las células que resulta en un aumento en la proliferación celular. Este incremento en la proliferación celular puede ser responsable del desarrollo neoplásico ya que el DNA es cada vez más sensible a mutaciones a lo largo de sucesivas divisiones celulares.

En general, los agentes epigenéticos se pueden considerar como promotores en la expansión de células espontáneamente iniciadas [2].

## **1.2.-ANATOMIA DE LA REGION MAMARIA**

La glándula mamaria es un órgano que produce leche y la anatomía microscópica se basa en esta función. Los lóbulos, también llamados unidades lobulares, producen leche. El sistema de conductos tiene un epitelio ductal rodeado por dos capas de mioepitelio, este sistema hace posible la eyección de leche; está sellado y rodeado por una membrana basal interrumpida. El estroma es un tejido que se encuentra entre los lóbulos, se conoce también como tejido conectivo y éste contiene capilares y células especializadas. En cuanto a la membrana basal del sistema de conductos, es esencial para visualizar, a nivel microscópico, el crecimiento de un tumor maligno de la glándula mamaria [1].

La patología mamaria es compleja y variada; su importancia clínica se define en base a los síntomas que se van presentando en el desarrollo glandular, los estímulos endócrinos del ciclo menstrual, los cambios propios del embarazo y la lactancia y los cambios involutivos durante la menopausia, así como al progresivo incremento en la frecuencia del cáncer mamario [1].

### 1.2.1.-Cáncer de seno

Las enfermedades de la glándula mamaria son de diferente naturaleza; comprenden lesiones constitucionales, congénitas, del desarrollo, infecciosas, traumáticas, quísticas, proliferativas, benignas y malignas, con inclusión de lesiones metastásicas de otro origen neoplásico [1].

El cáncer de mama es una enfermedad sistémica en la cual existe proliferación anormal de las células del epitelio glandular mamario (conductos, lobulillos) y en menor frecuencia del estroma (*Tabla 1*); de acuerdo a la región donde se presenta, hay una clasificación histopatológica, que en términos generales es: no infiltrante o *in situ* e infiltrante o invasor (*Tabla 2*) [3].

**Tabla 1.** Etiopatogenia del cáncer de mama [3].

TUMORES EPITELIALES	TUMORES NO EPITELIALES
*90%	**10%

\*Carcinoma lobulillar 10%, carcinoma ductal 80%. \*\* Del estroma de soporte, angiosarcoma, sarcomas primarios, tumor filoides, linfoma (raro).

**Tabla 2.** Clasificación histopatológica del cáncer de mama [3].

No infiltrante ( <i>in situ</i> )	Infiltrantes
<p><b>-Intralobulillar:</b> proliferación dentro de los lobulillos, Carcinoma Lobulillar <i>In Situ</i> (CLIS), es palpable, se descubre por biopsia ,raras veces se ve en la mamografía El CLIS , no es maligno pero indica aumento de riesgo de carcinoma infiltrante en cualquiera de las 2 mamas; 1-2 % presentan cáncer cada año</p> <p><b>-Intraductal :</b> (sólido, comedociano papilar , cribiforme proliferación dentro de los conductos , Carcinoma Ductal <i>In Situ</i> (CDIS), se detecta solo mediante mamografía (&gt; 80%),hallazgo frecuente microcalcificaciones 75 a 80% La enfermedad de Paget es una forma de CDIS</p>	<p><b>-Lobulillar infiltrante</b> <b>-Ductal infiltrante</b> - NOS* 80% de los carcinomas - Formas especiales medular típico Mucosecretante Adenoquistico Papilar Tubular Liposecretante Secretorio metaplásico</p>

\*NOS: No Especificado de Otra forma.

Es por tanto una patología en la cual no es suficiente el diagnóstico y, cuando se aplica tratamiento, se deben realizar seguimientos a las pacientes para evitar la reaparición local, cáncer contralateral y metástasis [3].

Del 100% de la epidemiología el 60% se ha atribuido a factores como edad, reproductivos, antecedentes personales y familiares, y del 40% restante no se han determinado las causas [3]. En términos generales, una de cada ocho mujeres padecerá cáncer de mama y en el mundo se diagnostica un nuevo caso cada quince minutos [1].

Existe riesgo de presentar cáncer de mama entre otros factores, por la edad y el tiempo de latencia de la enfermedad [3]. Tiene mayor mortalidad en pacientes jóvenes, casi siempre con factores pronósticos desfavorables; las neoplasias son poco diferenciadas, con mayor frecuencia de ganglios metastásicos, con invasión vascular y linfática y, extensión ductal [1].

La magnitud del problema del cáncer de seno es evidente en países como Gran Bretaña, Noruega, Finlandia, los Estados Unidos y Canadá, lugares donde el cáncer mamario es la neoplasia maligna más frecuente en la mujer y constituye un problema de salud pública. En los Estados Unidos se ha informado que una de cada ocho mujeres padecerá carcinoma de glándula mamaria en alguna etapa de su vida; esto significa que la población femenina de 20 a 75 años de edad estará en riesgo de sufrir este padecimiento [1].

El cáncer mamario en México ocupa el segundo lugar de frecuencia después del carcinoma cervicouterino y constituye la primera causa de mortalidad en la población femenina. También se considera que el nivel socioeconómico de la mujer la expone a diferentes factores de riesgo que incrementan las probabilidades de padecer cáncer de seno por prejuicios, pudor, indolencia, ignorancia y temor a descubrirse alguna anomalía en el cuerpo, por lo que se presta poca atención, en este caso, al examen de la región mamaria [1].

### **1.2.2.-Mutaciones genéticas: tres genes principales en el cáncer de seno**



De manera general, los genes del cáncer han sido divididos en dos clases: protooncogenes y supresores tumorales. Los primeros son alterados por la amplificación de cromosomas mediante reparación o restauración del cromosoma. Los genes supresores de neoplasias son inactivados por delección o mutación del cromosoma [1].

Los tres genes implicados en el proceso de formación del carcinoma mamario son el gen BCRA, *Her 2 neu* y el “guardián del genoma” P53:

- *BCRA*: se ubica en el cromosoma 17 y está involucrado en el cáncer mamario familiar y de ovario. Codifica una proteína que por lo regular es mutada por delección o inserción.
- *Her 2 neu*: se encuentra en el cromosoma 17 y su alteración genética se produce por amplificación de copias y, por tanto, sobreexpresión de la proteína producto. Su participación es en el carcinoma *in situ* y cáncer invasor, tanto en la mujer como en el varón.
- P53: gen supresor tumoral. Se encuentra también en el cromosoma 17 y se ve alterada por más de 500 tipos diferentes de mutaciones. Se le relaciona con diferentes tipos de cáncer [1].

### **1.2.3.-CÁNCER DE SENO EN HOMBRES**

Se debe considerar la presencia de este carcinoma en hombres que, a pesar de que es menos del 1% de los casos totales en México, es diagnosticado generalmente en etapas tardías [3]. Cifras mayores de frecuencia se hallaron en Egipto (5%), Dinamarca (8%), India y África (15%) que se vinculan con los factores ambientales que alteran el metabolismo hepático de los estrógenos [1].

En general, la edad en la que se presenta este padecimiento en varones corresponde un decenio mayor en comparación con la edad en que ocurre en la mujer, en otras palabras, la media de presentación es a los 65 años de edad. El sitio de aparición más habitual del tumor es el área retroareolar. Por la escasa cantidad de tejido areolar y glandular, la palpación es fácil de realizar así como el crecimiento y desarrollo de la neoplasia [1].

### **1.3.-LÍNEA CELULAR MCF-7**

Una de las líneas celulares cancerígenas que se maneja desde 1970 para su estudio es la MCF-7 de cáncer de mamá, que procede de una mujer de 69 años de edad, de raza caucásica, que fue sometida a dos mastectomías en un lapso clínico de cinco años, presentando tumor primario invasivo de carcinoma ductal [4].

Este tipo de línea celular tiende a crecer en colonias; están bien caracterizadas por expresar receptores a estrógenos y por esta razón es que son útiles en un modelo *in vitro* para estudiar el papel de los estrógenos en el cáncer de mama. MCF-7 es el acrónimo de la Fundación de Cáncer de Michigan- 7, también conocido como el Instituto de Cáncer Ana Bárbara Karmanos; hace referencia al instituto en Detroit en donde esta línea celular fue establecida en 1973 por Herbert Soule [4].

#### **1.4.- EL CAMPO MAGNÉTICO (CM)**

Existen fuentes naturales de campos magnéticos (CMs) que se generan por la acumulación de cargas eléctricas en determinadas zonas de la atmósfera por efecto de las tormentas y el campo magnético (CM) terrestre. Las aplicaciones que el hombre ha encontrado para las radiaciones magnéticas han generado numerosas fuentes, siendo la electricidad, con sus instalaciones de transmisión y distribución y los artefactos eléctricos, la principal fuente de CMs [2].

La velocidad de propagación de la radiación electromagnética (RE) depende de algunas características del medio en que se propaga, como su constante dieléctrica y la permeabilidad magnética. Las radiaciones electromagnéticas (REs) se caracterizan por su frecuencia de vibración ( $f$ ) o por su longitud de onda ( $\lambda$ ) [2].

La frecuencia es, simplemente, el número de oscilaciones de la onda por unidad de tiempo o ciclos por segundo, medido en múltiplos de un hertzio (Hz):

$$1 \text{ Hz} = 1 \text{ ciclo por segundo}$$

La longitud de onda es la distancia recorrida por la onda en una oscilación (o ciclo). Por consiguiente, la longitud de onda y la frecuencia están totalmente ligadas: cuanto mayor es la frecuencia, más corta es la longitud de onda [2].

Una onda electromagnética está formada por paquetes muy pequeños de energía llamados fotones. La energía de cada paquete o fotón es directamente proporcional a la frecuencia de la onda: cuanta más alta es la frecuencia, mayor es la cantidad de energía contenida en cada fotón [2].

Los CMs de baja frecuencia son ondas electromagnéticas y clasifican como radiaciones no ionizantes (RNI), por lo que poseen energía un millón de veces menor que la necesaria para romper enlaces químicos, lo que sí hacen las radiaciones ionizantes (RI) [2].

El espectro de las ondas magnéticas cubre un amplio rango de frecuencias que va desde algunos ciclos por segundo hasta un millón de ciclos por segundo, ya en la frontera de las radiaciones infrarrojas y visibles [2].

En la *tabla 3* se presentan las RNI según el tramo de espectro:

**Tabla 3.** RNI según el tramo del espectro\* [2].

1 Hz- 300 KHz	Radiación de baja frecuencia (LF) y de muy baja frecuencia (ELF). Campos eléctricos de aparatos, red eléctrica convencional, monitores de video, tramos de radio de Amplitud Modulada (AM).
300 KHz- 300 MHz	Radiofrecuencias (RF). Tramos de radio AM, radio de Frecuencia Modulada (FM), onda corta médica.
300 MHz- 300 GHz	Microondas (M.O). Aparatos domésticos para microondas, telefonía móvil 900- 1800 Mega Hertzio (MHz), microondas para fisioterapia médica, radar y otras comunicaciones por microondas.
300 GHz- 780nm	Infrarrojo (IR). Luz solar, aparatos para terapia con calor, láser.

\*Se distinguen dos grandes grupos de fuentes de exposición en el entorno: 1) las fuentes que generan campos de frecuencias inferiores a 3 Kilo Hertzio (KHz) y 2) las conocidas como fuentes de campos de radiofrecuencias que van de los 3KHz a los 300 Giga Hertzio (GHz).

#### **1.4.1.-Efectos de los CMs en los sistemas vivos.**

Se habla de efectos biológicos de la radiación para referirse a las consecuencias de la acción sobre los tejidos de los organismos. Los seres vivos disponen de mecanismos complejos que le permiten adaptarse a las numerosas y variadas influencias del medio, pero, no siempre pueden compensar todos los efectos, sobre todo cuando los cambios inducidos son irreversibles o el estímulo persiste durante lapsos prolongados [2].

La mayoría de los análisis teóricos de acciones de los CMs han enfatizado en los parámetros físicos y se han analizado modelos de células individuales o subsistemas de células únicas (principalmente membranas y magnetosomas). Con los modelos de sistemas multicelulares se observa que los CMs provocan cambios en diferentes niveles (ver *Fig. 2*) [2].

**CM**  $\Rightarrow$  **cambios físicos**  $\Rightarrow$  **cambios químicos**  $\Rightarrow$  **cambios biológicos**

**Figura 2.** Modelo de sistema multicelular aplicando CMs. La acción que ejercen los CMs sobre las células va de lo simple, hasta los procesos complejos de éstas mismas.

Una condición necesaria para la actividad biológica es que los cambios inducidos por los CMs excedan los cambios químicos naturales o de fondo propios de las células [2].

Los cambios en la biología de los tejidos o células son inducidos por los CMs a través de cambios bioquímicos, los cuales a su vez, deben tener un disparador, un proceso químico modulado metabólicamente que es sensible a estos campos. Una consideración clave es la magnitud del cambio químico inducido por los CMs con respecto a los cambios que naturalmente ocurren en el mismo proceso químico, el cual constituye un “fondo químico”. Por ejemplo, la señal inducida por el CM, puede generar un cambio acumulado en flujo iónico o molecular [2].

La respuesta biológica a una exposición ambiental requiere una dosis suficiente como condición necesaria pero no única. La evaluación de los posibles efectos perjudiciales para la salud de los CMs exige la realización de diversos estudios en diferentes campos de investigación. Podemos distinguir básicamente tres

tipos estudiados: a) los que utilizan cultivos celulares, b) los realizados sobre animales de experimentación y c) los estudios epidemiológicos en humanos [2].

Los estudios en laboratorio con células están orientados a identificar los mecanismos básicos, moleculares o celulares, que relacionan la exposición a CMs con los efectos biológicos. Los estudios con animales de experimentación están orientados a investigar los efectos biológicos y relación entre dosis y respuesta para diferentes intensidades de CMs; proporcionan resultados de niveles máximos permisibles de exposición que garanticen condiciones de seguridad para la salud de las personas. Los estudios epidemiológicos en seres humanos investigan la causa y distribución de las enfermedades en las condiciones reales por comunidades y grupos profesionales [2].

Los efectos de un agente físico o químico sobre un organismo dependen en gran medida de la dosis. En el caso de los CMs la dosis guarda relación con la intensidad del campo y el tiempo que dure la exposición. La correcta evaluación de los efectos de los CMs sobre la salud exige establecer la relación dosis- respuesta y, por lo tanto, una caracterización adecuada y completa de la exposición. Así, la evaluación a exposición ha sido uno de los aspectos más controvertidos en el análisis de la evidencia científica de los efectos sobre la salud, dado que la validez de los hallazgos de enfermedad asociados a CMs dependerá en gran medida de la correcta valoración de dicha exposición [2].

#### 1.4.2.-Dispersión y cambios celulares

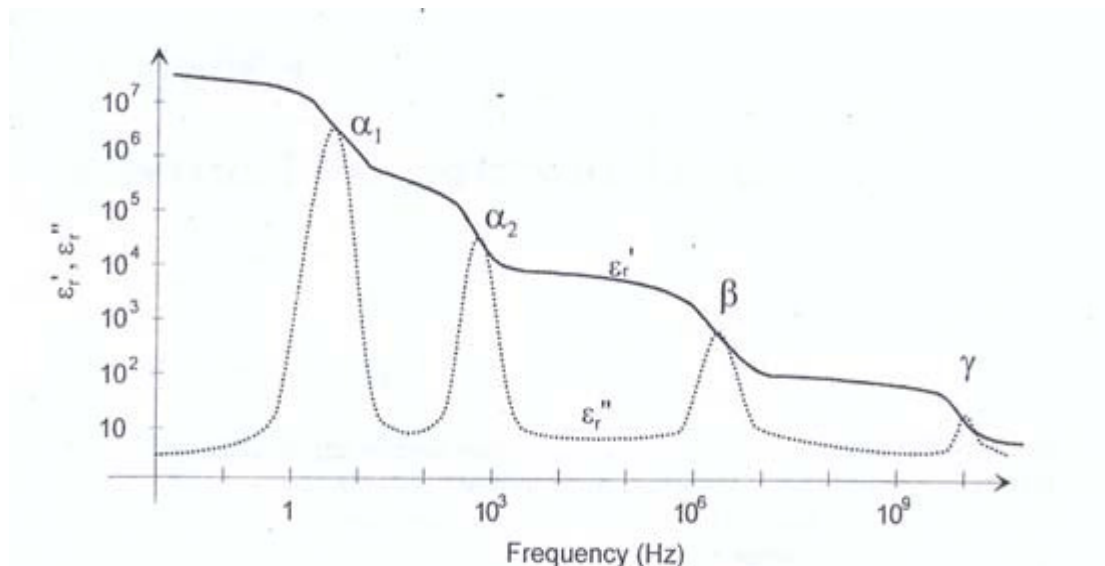
En 1975 Schwan propuso el modelo eléctrico de dispersión dependiente de frecuencia y el cambio que provocan en las células. Para ello estudió biomateriales a frecuencias que iban desde los MHz hasta los GHz (*Tabla 4*) [5].

**Tabla 4.** Tipo de dispersión para frecuencias específicas y los cambios celulares que provocan [5].

Tipo de dispersión	Frecuencia característica	Mecanismo celular
	MHz- KHz	Efectos en la superficie de la membrana, activación del canal iónico por la membrana celular, modificación de

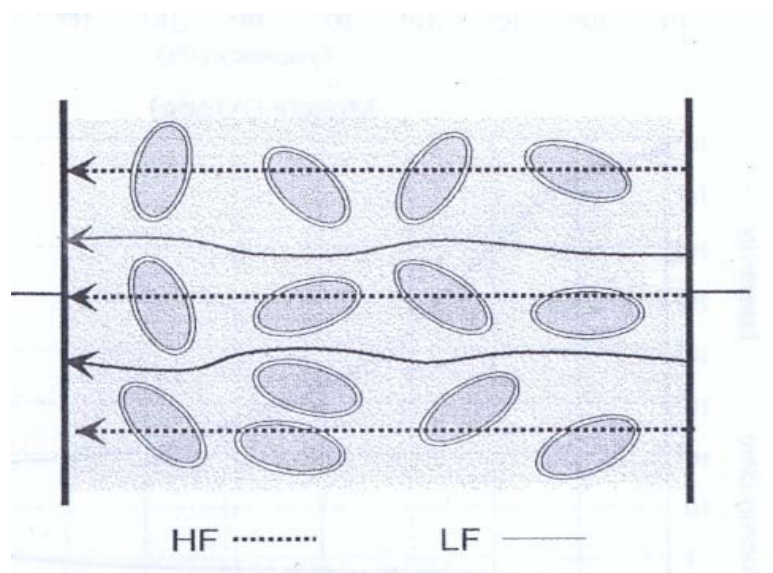
$\alpha$ (alfa)		estructuras intracelulares, en la difusión iónica y pérdida de dielectricidad por la baja conductividad.
$\beta$ (beta)	0.1- 100 MHz	Efecto Maxwell- Wagner, capacitancia pasiva en la célula, modificación intracelular de las membranas de los organelos, respuesta de moléculas de proteínas.
$\gamma$ (gamma)	0.1- 100 GHz	Mecanismo dipolar en medios polares tales como en agua, sales y proteínas.

La dispersión está relacionada con el comportamiento eléctrico y físico de las moléculas en las células. Una de las propiedades de la dispersión es la relajación: es un proceso a nivel molecular que se refiere a la implicación de dos niveles de frecuencias; cuando hay un cambio de nivel para pasar de una frecuencia a otra existe una zona de transición donde hay un estado de relajación de las moléculas involucradas en esto; de acuerdo a donde se presente este cambio de nivel se definirá si hay un nivel de dispersión  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  (ver Fig.3) [5].



**Figura 3.** Gráfica de tipos de dispersión celular. La relajación molecular en las células dependerá del cambio de una frecuencia a otra (Tomada de Grimnes y Martinsen, 2000 [5]).

Cuando se inducen CMs de diferentes frecuencias sobre algún tejido, la respuesta de las células será diferente de acuerdo a si son frecuencias altas, intermedias o bajas. Se considera que la membrana celular tiene capacitancia alta y baja, en cuyo caso dependerá de la función que este ejerciendo la célula en determinado momento, así mismo juega un papel fundamental en el paso, no sólo de iones, sino de las corrientes producidas por la inducción de CMs de determinadas frecuencias. En este sentido, al aplicar frecuencias bajas (LF) éstas sólo rodearán las células porque éstas frecuencias no son lo suficientemente fuertes para modificar la capacitancia de la membrana celular; por otro lado, al aplicar frecuencias altas (HF) cambia la capacitancia de la membrana permitiendo entonces la entrada de corrientes de estas frecuencias y modificándose procesos internos de los organelos de las células (ver Fig. 4) [5].



**Figura 4.** Paso de corrientes en las células por la inducción de CMs de bajas y altas frecuencias (HF y LF). Las bajas frecuencias rodean a la célula y las altas frecuencias pueden atravesar la membrana celular (Tomada de Grimnes y Martinsen, 2000 [5]).

## **2.-ANTECEDENTES**

En las últimas tres décadas ha ido en aumento el interés y la preocupación por los efectos sobre la salud de los CMs. Desde finales de los años setentas se han publicado aproximadamente 25, 000 artículos sobre los efectos biológicos y aplicaciones médicas de la RNI [3].

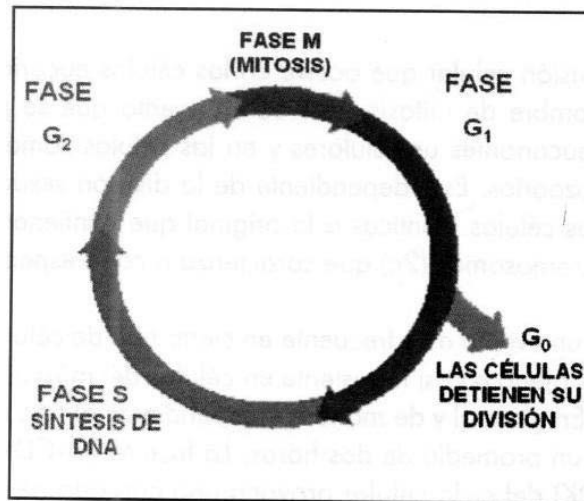
Diferentes estudios que se han realizado con CMs, enfatizan en el cambio que sufre la célula en dos de sus funciones básicas: el primero se refiere a cambios que sufre la célula en alguna etapa de la mitosis así como su orientación al realizar la división de las dos células hijas y, el segundo se refiere a la afectación de la bomba Sodio- Potasio ( $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ ), en donde se involucra el sistema de cotransporte de los dos solutos diferentes por el cambio del gradiente electroquímico, modificándose el potencial eléctrico y, por lo tanto, el potencial de membrana.

### **Ciclo celular [6]**

La división celular que ocurre en las células eucariontes recibe el nombre de mitosis. Es independiente de la división sexual o meiosis y tiene como objetivo producir dos células idénticas a la original, que contienen el número diploide de cromosomas ( $2n$ ) que caracteriza a cada especie.

En general y de manera independiente al tipo de célula, la mitosis dura un promedio de dos horas [6]. Un ciclo celular se divide en dos fases que son la Interfase, conteniendo tres subfases:  $G_1$ , Síntesis (S), y  $G_2$  [7] (ver *Fig.5*). La mitosis, en un inicio fue descrita por varios autores, sin embargo, Walter Fleming utilizó el microscopio óptico y diferentes técnicas de tinción con anilinas para observar células de embriones de salamandra y describir, finalmente en 1882, una amplia reseña de las cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. Actualmente, con los avances en la observación al microscopio de fluorescencia, el transmisor de electrones y las técnicas de biología molecular, se reconocen seis fases relacionadas con la división mitótica de los cromosomas y del citoplasma: profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis.





**Figura 5.** Etapas del ciclo celular. La Interfase (G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>) y la Mitosis (profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) (Tomada de Heredia y Castañeda, 2009 [6]).

En la Interfase, en G<sub>1</sub> se produce la acumulación de Adenosin Trifosfato (ATP) necesario para el proceso de división y el incremento de tamaño celular; la subfase S es donde se replica el DNA nuclear y, finalmente en G<sub>2</sub> la célula se prepara para la Mitosis, ésta última es donde culmina el ciclo celular con la división de la cromatina duplicada previamente para que cada célula hija tenga una copia del material genético de la célula original [6].

Los cromosomas una sola vez replicados en la fase S del ciclo celular y formados por dos cromátides hermanas, se condensan y el núcleo se ve “hinchado”, además de que se pueden observar grumos de cromatina llamados cromómeros y que los nucléolos han desaparecido. Al entrar a mitosis la célula pierde su adhesión a otras células y a la matriz extracelular, por lo que adquiere una forma esférica.

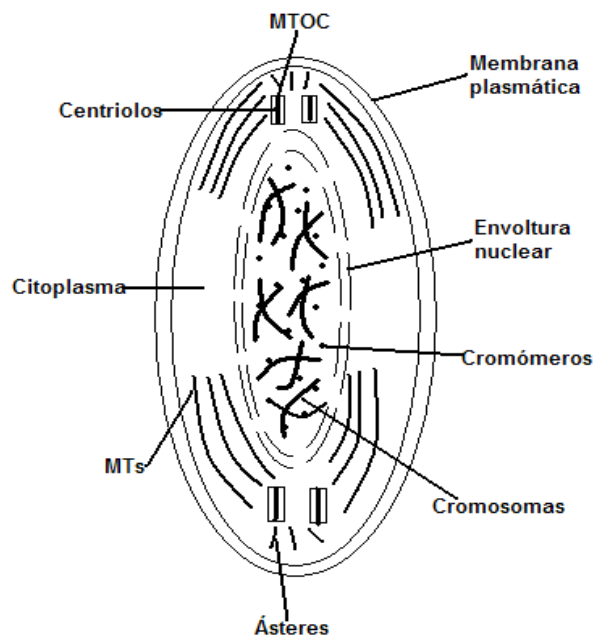
Por fuera y cerca del núcleo, los dos Centros Organizadores de los Microtúbulos (MTCOs) que también se replicaron de forma conservativa y una sola vez en la fase S, se separan e inician, a partir de los Microtúbulos (MTs) del citoesqueleto, el ensamble del huso mitótico.

En esta fase la polimerización (rescate +) y despolimerización (catástrofe +) de los MTs, aumenta de velocidad, por lo que su vida media es más corta que la que tienen durante la Interfase. En células animales los centrosomas alojan a

los centriolos y organizan a los MTs formando a los ásteres del huso (mitosis astral).

### Profase

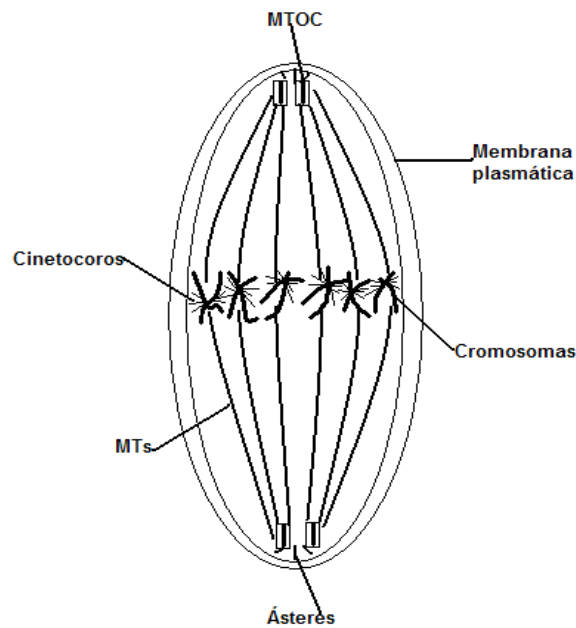
Durante esta fase inicia la fosforilación de los filamentos intermedios (o láminas nucleares de la envoltura nuclear) en la mayor parte de las células, excepto en hongos o algas donde esta membrana no se fragmenta y está presente a lo largo de toda la mitosis. La profase termina y la prometafase inicia cuando los cromosomas empiezan a unirse a los MTs al romperse la envoltura nuclear (ver *Fig.6*).



**Figura 6.** Profase. Fosforilación de elementos intermedios.

### Prometafase

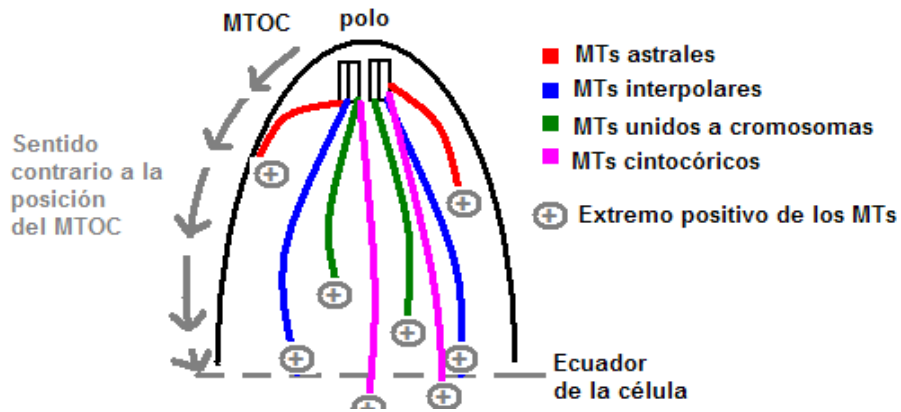
Se caracteriza por dos eventos: el inicio de la unión de los cinetocoros a los MTs y la fragmentación de la envoltura nuclear, así como su “desaparición” al microscopio óptico. Realmente lo que sucede es que la fosforilación de las láminas unidas a la envoltura nuclear interna se ha completado, lo que provoca la formación de microvesículas que se liberan al citoplasma junto con los cromosomas condensados, los componentes del poro nuclear y las láminas nucleares (ver *Fig.7*).



**Figura 7.** Prometafase. Fosforilación de láminas unidas a la envoltura nuclear.

### Metafase

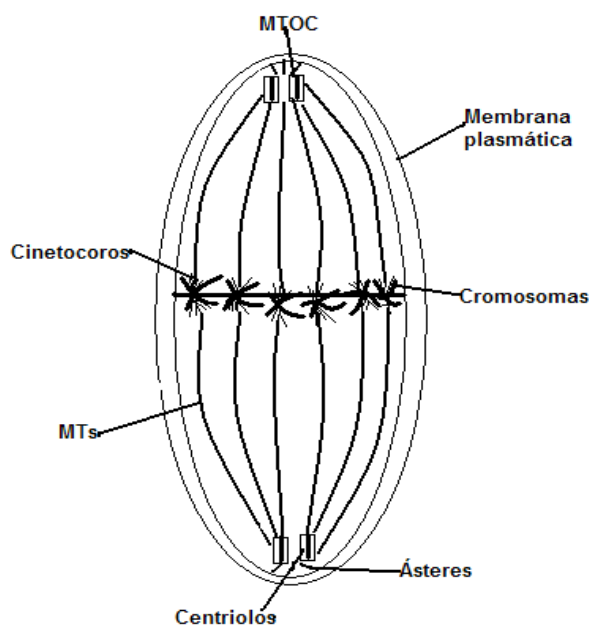
Al inicio de esta fase todos los cinetocoros están unidos a cientos de MTs. En el huso mitótico se encuentran cuatro tipos de MTs que salen de los polos con sus extremos (+) en sentido contrario a la posición de los MTCOs: los astrales que irradian en todas las direcciones de los centrosomas o polos nucleares hacia la membrana de la célula, los interpolares cuyos extremos (+) se superponen en el ecuador de la célula, no se unen a los cromosomas, los que se unirán a los brazos o cromátides de los cromosomas y los cinetocóricos que están unidos, o se unirán, a los cinetocoros de los cromosomas metafásicos y los alinearán en el ecuador de la célula, formando la placa ecuatorial (ver *Fig. 8*). Varias proteínas se unen a cualquier cinetocoro que no se encuentre unido a todos los MTs cercanos, principalmente a la proteína Mad2p, que determina el punto de verificación de la metafase/ anafase e impide la activación del Complejo Promotor de Anafase (APC).



**Figura 8.** Los cuatro tipos de MTs del huso mitótico. Involucrados en la metafase.

Los cromosomas metafásicos se colocan en la mitad de la célula como resultado de tres eventos (ver *Fig. 9*):

- 1 Los cinetocoros de cada cromátida hermana se orientan hacia el polo del huso mitótico que tienen enfrente
- 2 Cada cinetocoro de cada cromátida se une a cientos de MTs
- 3 Las cohesinas mantienen unidas a las cromátides por el centrómero, por lo que el balance entre dos fuerzas, una polimerización mayor en el extremo (+) y una despolimerización leve en el extremo negativo (-), “empujan” a los cromosomas y hace que se coloquen en la mitad del huso.



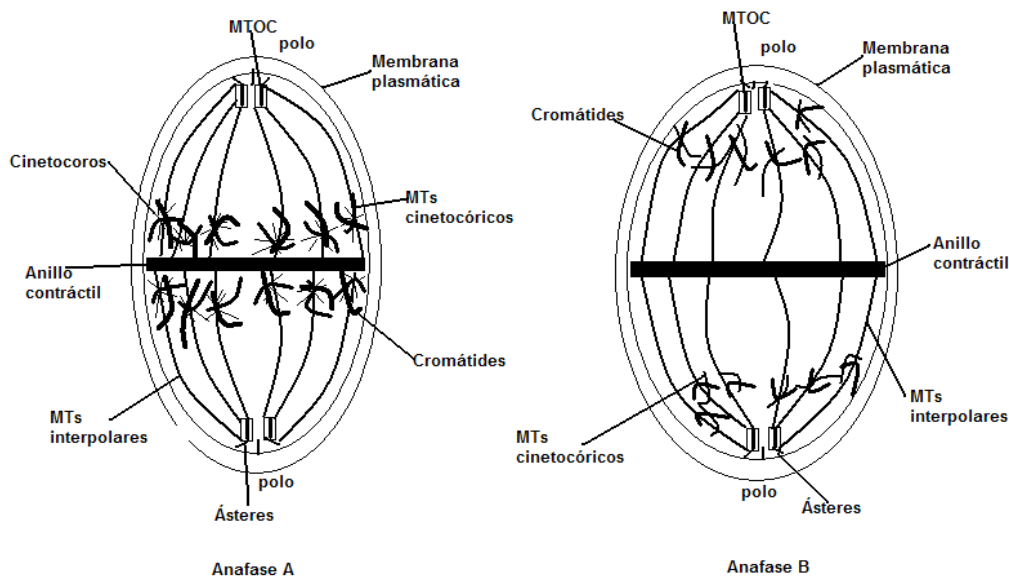
**Figura 9.** Metafase. Los cinetocoros están unidos a cientos de MTs.

### Anafase

Esta fase se presenta sólo cuando los cinetocoros de todos los cromosomas están unidos a todos los MTs cinetocóricos, lo que es parte de una señal de verificación (*Spindle- Attachment Checkpoint*) que induce el paso de la metafase a la anafase (fase M/ A del ciclo celular). Durante anafase las cromátidas hermanas de los metafásicos se separan y migran hacia los polos. Sólo si la proteína Mad2p no está unida a algún cinetocoro (porque ha migrado a los polos y cada cromátida hermana está orientada hacia el polo opuesto), inicia anafase.

En anafase el APC ubiquitina a dos proteínas: M- Cdk y securina. La unión de APC con Cdc20 forma un complejo APC- Cdc20 que actúa como ligasa y ubiquitina a M- Cdk provocando su destrucción en el proteosoma. El complejo APC- Cdc20 ubiquitina también a la securina del complejo securina-separasa, por lo que la separasa se activa e hidroliza a las cohesinas que unen a las cromátides en la región centromérica. Lo anterior provoca que se separen las cromátidas y ya libres, migren a cada polo correspondiente del huso.

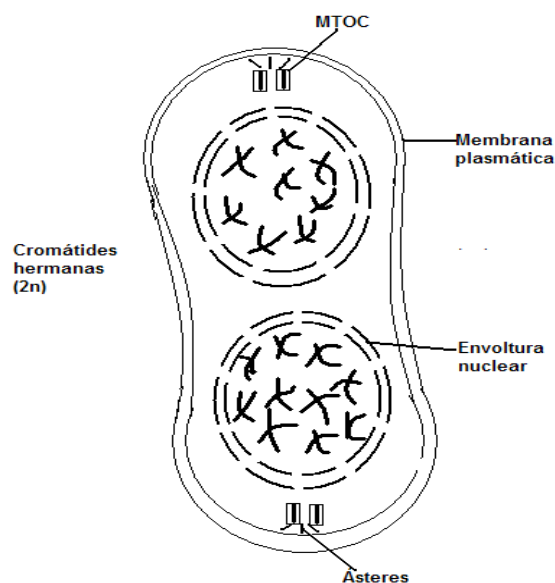
Por depolimerización en el extremo (+) de los MTs del cinetocoro, éstos se acortan sin desprenderse de los cromosomas, de esta manera, cada cromátida hermana es jalada en sentido opuesto y hacia los polos (anafase A). Mientras tanto, el huso mitótico se alarga debido al aporte de tubulina en los extremos (+) de los MTs interpolares que se deslizan uno sobre otro en el ecuador, mientras que un impulso separa a los polos (anafase B) (ver *Fig. 10*). En la mayor parte de las células, la citocinesis o división del citoplasma inicia en la anafase y termina al final de la telofase. Empieza la distribución homogénea de las mitocondrias, la distribución del Aparato de Golgi y el reensamble del retículo endoplásmico.



**Figura 10.** Anafase. Las cromátidas hermanas de los metafásicos se separan y migran hacia los polos.

### Telofase

Un juego completo de (2n) de cromátidas hermanas llega a cada polo del huso y se desprende de los MTs. A partir de las microvesículas y por acción de las fosfatasas, las láminas nucleares son desfosforiladas, incorporan a los complejos del poro y se vuelve a ensamblar la envoltura nuclear alrededor de los cromosomas (una cromátida de cada homólogo) (ver Fig. 11). La citocinesis continúa y concluye al final de esta fase.

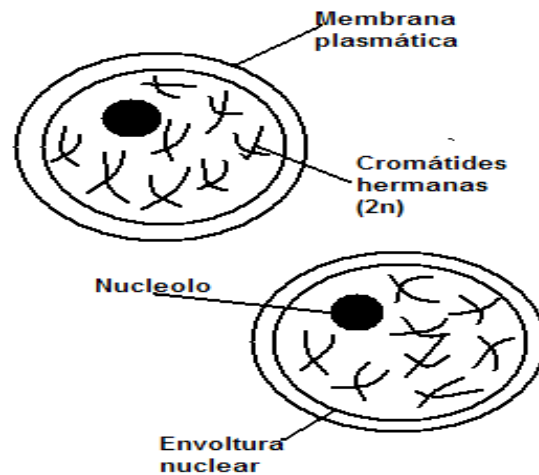


**Figura 11.** Telofase. Un juego completo de (2n) de cromátidas hermanas llega a cada polo del huso.

### Citocinesis

La citocinesis o división del citoplasma en células animales, tiene cuatro fases: inicio, contracción, inserción de membrana y terminación. En la mayoría de las células la zona por la que se dividirá el citoplasma depende de la interacción entre los MTs astrales, las proteínas motoras, una corteza proteica motora debajo de la membrana plasmática y del sitio en donde los MTs interpolares, se superponen. Inicia por acción de las proteínas de la familia de las quinasas tipo polo (*polo-like-kinases*) que regulan y coordinan el avance de la mitosis con la citocinesis. La división puede ser simétrica o asimétrica, en cuyo caso ciertos componentes de la célula son segregados a una de ellas. Inicia por la presencia de un anillo contráctil formado por actina, filamentos de la proteína bipolar miosina II y otras proteínas reguladoras.

El anillo se contrae en la célula original partiendo de la membrana plasmática y hacia adentro alrededor de remanentes de los MTs interpolares en el centro de la célula, continuando hasta formar un cuerpo medio dentro de una matriz densa que finalmente, facilita la división o abscisión en dos del citoplasma. Se ha visto que los MTs estabilizan el anillo y pueden activar a algunas ATPasas de la familia Rho que a su vez, estimulan la polimerización de actina. Al mismo tiempo, se aporta rápidamente membrana nueva por fusión de vesículas intracelulares, lo que compensa el aumento de la superficie derivada de la formación de dos nuevas células (ver *Fig. 12*).



**Figura 12.** Citocinesis. Formación de dos nuevas células.

### Citoesqueleto en la mitosis

Se sabe que el huso mitótico (estructura motora bipolar) se forma durante la mitosis a partir del citoesqueleto de la célula y depende de la organización de los MTs. Todos los MTs tienen en ambos extremos zonas de polimerización de tubulina (+) y de despolimerización (-) denominado extremo (+) al que presenta mayor polimerización que despolimerización y extremo (-) a lo contrario. En dichos extremos se producen fuerzas o impulsos mecánicos que responden a un balance entre diferentes familias de proteínas motoras (ATPasas) dependientes de ATP, principalmente de la familia de las quinesinas y de las dineínas. Las quinesinas se mueven generalmente hacia los extremos (+) y las dineínas hacia los extremos (-).

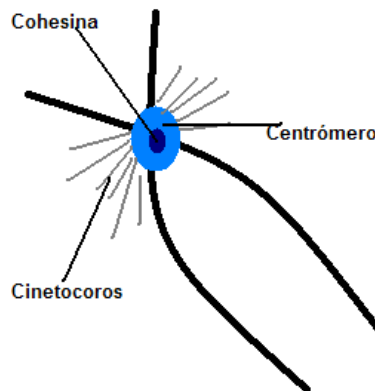
La relación entre los cromosomas y los MTs ocurre durante toda la mitosis y puede dividirse en cinco rubros:

- 1 La unión de los cromosomas a los MTs
- 2 Las respuestas de los cromosomas a los MTs
- 3 La polimerización de la tubulina y el movimiento de los cromosomas
- 4 Los mecanismos que mueven a los cromosomas mitóticos
- 5 Las interacciones entre los MTs y los cinetocoros



## La unión de los cromosomas a los MTs

Durante la mitosis los cromosomas se unen a los MTs de dos maneras: por cinetocoros o por las cromátidas. La relación entre éstos y los movimientos en el huso se dan por acción de los centrosomas o cuerpos interpolares y por la unión de las cromátidas por proteínas de cohesión o cohesinas (ver *Fig.13*).

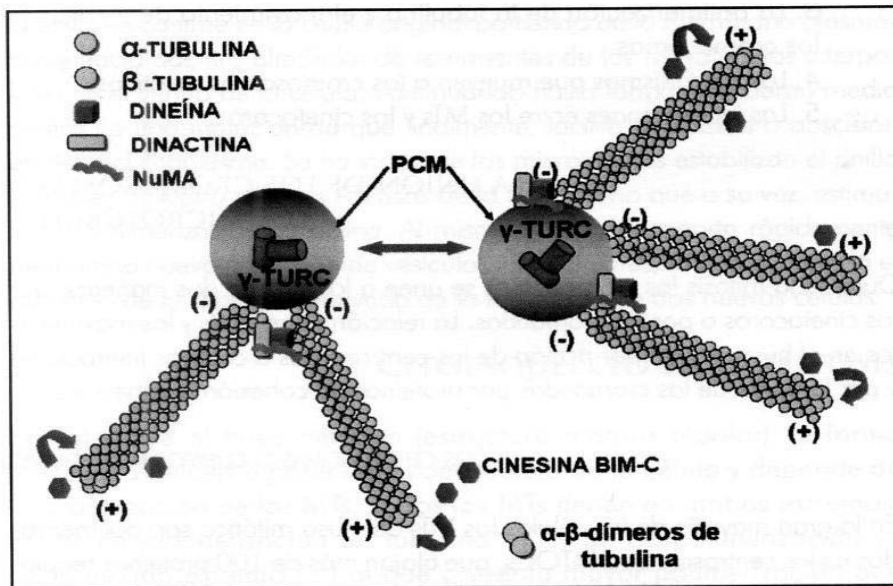


**Figura 13.** Constitución de los cromosomas para la mitosis. Las cohesinas serán importantes para la unión entre los cromosomas y MTs.

## Los centrosomas o cuerpos polares

En la gran mayoría de las células los MTs del huso mitótico son polimerizados en los centrosomas o MTCOs que alojan más de 100 proteínas reguladoras de funciones diferentes como la citocinesis, el control del ciclo celular, la respuesta al estrés y la organización de las respuestas de transducción. Los centrosomas contienen muchas copias del complejo anular de tubulinas gamma ( $\gamma$ -TURC) embebido en el material pericentriolar (PCM). Cada  $\gamma$ -TURC, en células animales, se une por una o más proteínas fibrosas al centriolo.

Intervienen en la polimerización de la tubulina: la dineína que participa en la formación de los ásteres, la dinactina y la proteína fibrosa NuMA que es regulada por RAN, que es una proteína dependiente de Guanosin Trifosfato GTP (GTPasa). Los extremos (-) de los MTs se orientan hacia los centriolos o cuerpos polares y los extremos (+) de los MTs irradian hacia fuera, por lo que la  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina siempre están incorporándose como dímeros en sentido contrario al complejo  $\gamma$ -TURC con la intervención de la quinesina BIM-C (ver *Fig.14*).



**Figura 14.** Proteínas que intervienen en la polimerización de la tubulina. En la gran mayoría de las células los MTs del huso mitótico son polimerizados en los centrosomas o MTCOs que alojan más de 100 proteínas reguladoras funcionales para el ciclo celular (Tomada de Heredia y Castañeda, 2009 [6]).

Una vez que se ha formado el huso, pueden eliminarse los centrosomas y los ásteres sin que se afecte la segregación posterior de los cromosomas. Se sugiere que posteriormente los MTs se separan de los centrosomas y se unen a proteínas motoras fibrosas que quitan la tubulina de los extremos (-) jalando los MTs hacia los polos.

La unión de centrómeros y cromátidas por proteínas de cohesión

Durante la replicación del DNA en la fase S del ciclo celular, las cromátidas hermanas se mantienen unidas por sus brazos y en la región de la heterocromatina pericentromérica mediante la intervención de tres complejos proteicos que son: el factor de establecimiento de la cohesión Ctf7 p/Eco1 p, los factores Scc2p y Scc4p y los factores estructurales de cohesión Smc3p, Mcd1 p/ Scc1 p e Irr1 p/ Scc3p.

En la profase las cromátidas se condensan unas 100 a 10, 000 veces auxiliadas por estas proteínas. Al mismo tiempo, los centrómeros (regiones ricas en Adenina y Timina) se asocian con más de 25 proteínas específicas y forman los cinetocoros que intervienen en la unión con los MTs y la distribución

de los cromosomas. En el centrómero, un número aproximado de 120 pares de bases de DNA satélite-  $\alpha$  se une con un tipo especial de histonas denominadas CenH3/ H4 formando hemiosomas en lugar de nucleosomas, como ocurre en la cromatina de las otras regiones del cromosoma. Debido a que el DNA entre cada hemiosoma (*DNA linker*) es más largo, a la región del centrómero se le facilita unirse a las proteínas y formar el cinetocoro.

#### Las respuestas de los cromosomas a los MTs

Cuando el extremo (+) del MT que proviene de un polo se une por azar al cinetocoro de una cromosoma (monoorientado), éste muestra al cinetocoro de su cromátida hermana hacia el polo contrario, lo que favorece que se una con un MT del polo opuesto (biorientado).

Los cromosomas monoorientados se mueven hacia el polo (movimientos P) al cual están unidos mediante un MT, sin embargo, también se mueven en sentido opuesto (movimientos AP) lo que produce oscilaciones de los cromosomas que varían durante la prometáfase. Después de la biorientación, el movimiento P de un cinetocoro produce el movimiento AP del cinetocoro hermano con la misma velocidad pero en periodos distintos, de ahí que se vean las oscilaciones.

#### La polimerización de la tubulina y el movimiento de los cromosomas

Una vez que los MTs se han unido a los cinetocoros (microtúbulos cinetocóricos: KMTs) ocurre en ellos una adición y pérdida de tubulina con una ganancia neta semejante a la de los extremos (+) libres de los MTs que, de igual manera, es dependiente de la hidrólisis de Guanosin Trifosfato (GTP) y de la proteína RAN. Diversos experimentos han demostrado que la polimerización de tubulina en el extremo (+) provoca el movimiento AP que aleja a los cromosomas de los polos y los empuja hacia el ecuador (concreción).

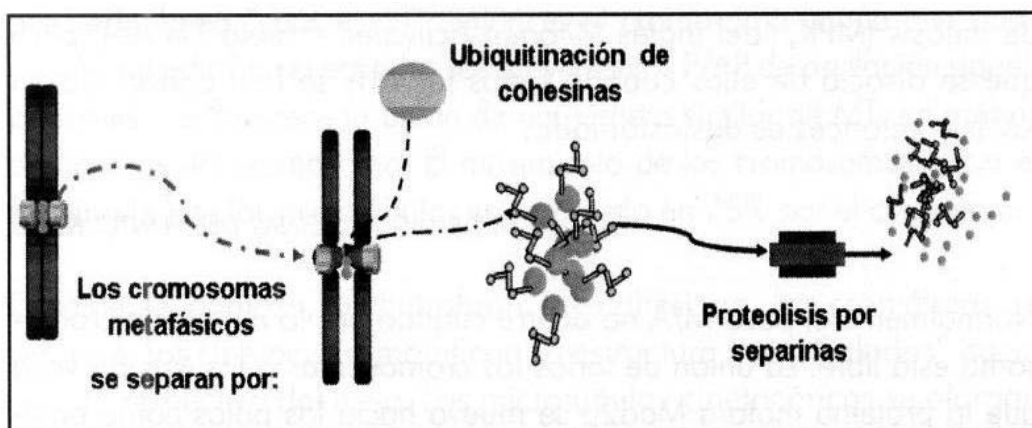
#### Los mecanismos que mueven a los cromosomas mitóticos

Los factores que contribuyen al movimiento mitótico de los cromosomas son la polimerización y despolimerización de los MTs, su flujo hacia los polos y la presencia de enzimas y proteínas motoras.

Las enzimas motoras llevan a cabo tres mecanismos: se asocian como puentes entre MTs adyacentes o entre ellos y otras estructuras, transportan determinadas estructuras o moléculas a lo largo de los MTs y, por último, regulan el ensamblaje de los MTs y acoplan los movimientos de éstos con su crecimiento y despolimerización. Se ha demostrado que durante la mitosis los movimientos no se deben a un solo tipo de proteínas motoras, sino al balance dinámico y complementario o antagonista entre ellas. Sus acciones pueden describirse por su relación con los cinetocoros, los brazos de las cromátidas, los MTs interpolares y los polos del huso.

#### Interacción entre los cinetocoros y los MTs en anafase

Los movimientos que ocurren durante anafase son de dos tipos: la migración de los cromosomas hacia los polos (anafase A) y el alejamiento de los polos por crecimiento de los MTs interpolares en el extremo (+) (anafase B). La anafase inicia con la separación de las cromátidas por la ubiquitinación de las cohesinas que las unen y su proteólisis mediada por proteasas de la familia de las separinas (ver *Fig.15*). El flujo de los cromosomas hacia los polos depende en parte de la exotubulasa Kin I y de ciertos componentes de los MTs como la actina o de una matriz fibrosa [6].



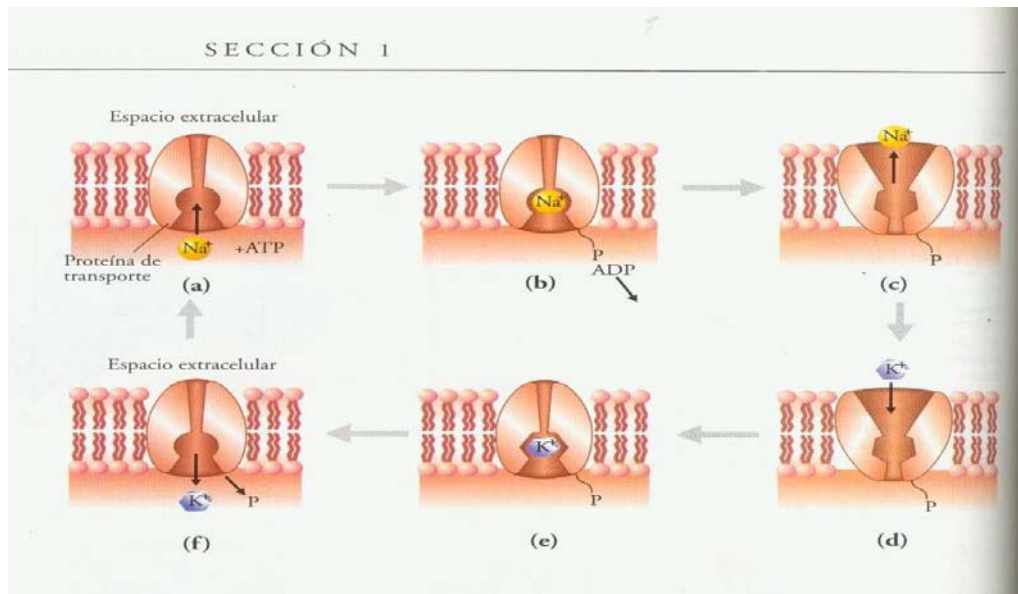
**Figura 15.** Separación de cromátidas por ubiquitinación. La anafase inicia con la separación de las cromátidas por la ubiquitinación de las cohesinas que las

unen y su proteólisis mediada por proteasas de la familia de las separinas  
(Tomada de Heredia y Castañeda, 2009 [6]).

### **Bomba de Sodio/ Potasio ( $\text{Na}^+$ / $\text{K}^+$ )**

Uno de los sistemas de transporte activo más importantes y mejor conocido es el de la bomba  $\text{Na}^+$ /  $\text{K}^+$ , presente en todas las células animales. La mayoría de las células mantienen un gradiente de concentración de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) a través de la membrana celular: el  $\text{Na}^+$  se mantiene a una concentración más baja dentro de la célula y el  $\text{K}^+$  se mantiene a una concentración más alta. La bomba de sodio- potasio requiere energía que es aportada por la molécula ATP.

El bombeo de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es llevado a cabo por una proteína *carrier* o transportadora, que existe en dos configuraciones alternativas (ver *Fig.16*). Una configuración tiene una cavidad que se abre al interior de la célula, en la cual encajan los iones  $\text{Na}^+$ ; la otra tiene una cavidad que se abre hacia afuera, en la cual encajan los iones de  $\text{K}^+$ . De esta forma, el  $\text{Na}^+$  dentro de la célula se une a la proteína de transporte. Simultáneamente, una reacción que involucra al ATP, libera energía y da como resultado que un grupo de fosfato se una a la proteína. Esto provoca un cambio de la proteína a la configuración alternativa y la liberación del  $\text{Na}^+$  en el lado externo de la membrana. Ahora, la proteína de transporte está lista para captar  $\text{K}^+$ , lo cual da como resultado la liberación del grupo fosfato de la proteína, haciendo que esta vuelva, así, a la primera configuración y libere el  $\text{K}^+$  en el interior de la célula. Este proceso genera entonces un gradiente de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a través de la membrana.



**Figura 16.** Configuración de la proteína *carrier*. Las dos formas alternativas permiten que se lleve a cabo la Bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  (Tomada de Curtis y Barnes, 2004 [8]).

La bomba de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ , al regular el pasaje de estos iones, controla el volumen de las células animales. El gradiente generado por la bomba tiene asociada una energía potencial eléctrica que puede ser aprovechada en el transporte activo de otras sustancias que deben atravesar la membrana contra gradiente de concentración, por ejemplo, la glucosa que debe de entrar a las células del epitelio intestinal. Un hecho interesante es que el transporte de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por la bomba es asimétrico: por cada tres  $\text{Na}^+$  transportados al medio externo, la bomba ingresa dos iones de  $\text{K}^+$ . El transporte de tres cargas positivas hacia afuera por cada dos cargas positivas que ingresan produce una deficiencia de cargas positivas en la cara interna de la membrana, generando una diferencia de potencial eléctrico entre ambas caras. De esta forma, la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  contribuye a generar parte del potencial eléctrico de membrana en las células animales [8].

#### Potencial de membrana y potencial de acción

La mayoría de las células mantiene una diferencia de potencial eléctrico a través de su membrana plasmática y, en estado de reposo, el interior es negativo con relación al exterior, esto es el potencial de membrana ( $V_m$ ) y se

refiere al potencial en cualquier momento. En las células excitables la mayoría de las señales implican cambios en el potencial de membrana:

- Hiperpolarización: aumenta el potencial de membrana
- Despolarización: disminuye el potencial de membrana

En las células excitables ese potencial de reposo negativo muestra intensos cambios transitorios durante la actividad, es lo que se conoce como potencial de acción. Estos potenciales se originan como consecuencia de la desigual distribución de iones a través de la membrana junto con las características de permeabilidad para cada uno de los iones. La hiperpolarización disminuye la habilidad de las células para generar potenciales de acción (es una señal inhibidora), mientras que la despolarización aumenta la posibilidad de generación de un potencial de acción (señal excitadora).

Por otra parte, el potencial de membrana en reposo se determina por el flujo de iones a través de los canales iónicos pasivos (canales que están siempre abiertos, no dependen de la unión de un ligando o de cambios de voltaje). Las concentraciones de iones dentro y fuera de la célula se mantienen gracias al equilibrio entre dos fuerzas:

- Una química: el gradiente de concentración
- Una eléctrica: la diferencia de potencial eléctrico

De tal manera que existe un potencial que engloba a ambas fuerzas denominado: potencial electroquímico.

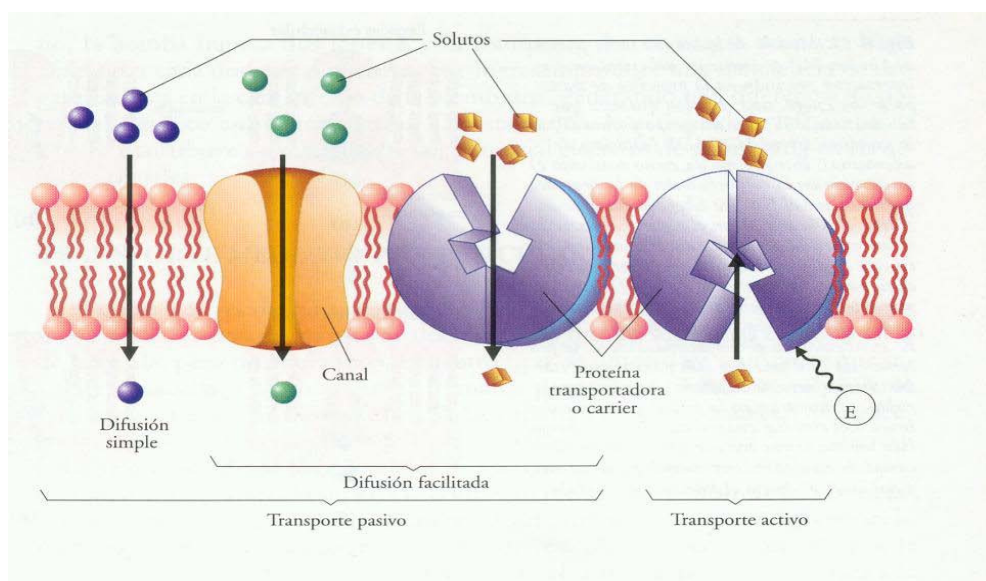
Si una célula fuera totalmente permeable al  $K^+$  e impermeable a todos los demás iones, el  $K^+$  se movería según su gradiente electroquímico hacia el exterior y la célula tendría un  $V_m$  de unos 100 mV; o sea, sería igual al potencial de equilibrio para el  $K^+$ . Si por el contrario, fuese permeable al  $Na^+$  e impermeable a todos los demás, su potencial de membrana sería igual a 55 mV. Sin embargo, las células reales, como se describió anteriormente, son parcialmente permeables al  $Na^+$  y al  $K^+$ , por lo que su potencial de membrana tendrá un valor intermedio. Este valor depende de las permeabilidades al  $Na^+$  y  $K^+$ . En las células excitables estas permeabilidades no son iguales y en reposo la permeabilidad para el  $K^+$  excede en mucho a la permeabilidad para el  $Na^+$ ,

porque hay menos canales para el  $\text{Na}^+$ , entonces el potencial de membrana en reposo se encuentra próximo al potencial de equilibrio para el  $\text{K}^+$ : es lo que se denomina potencial de reposo y es de alrededor de  $-70 \text{ mV}$ .

Por lo tanto, cuando el potencial de membrana está determinado por dos o más iones, cada ión tiene una influencia que viene determinada por su concentración dentro y fuera, y por la permeabilidad de la membrana de tal ión.

El  $\text{Na}^+$  sale de la célula y el  $\text{K}^+$  entra debido a que sus gradientes electroquímicos netos así lo determinan. Esto conduciría gradualmente a la disipación de los gradientes iónicos si no fuera por la existencia de la bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ . Gracias a ella el flujo neto de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  es cero en reposo. Así que en potencial de reposo la célula no está en equilibrio, sino en un “estado estacionario” gracias a la energía del ATP.

El potencial de acción es una despolarización transitoria de la membrana, de manera que el interior de la célula se hace + con respecto al exterior, que es -. Esto ocurre de la siguiente manera: aparte de los canales de  $\text{Na}^+$  por los que difunde el  $\text{Na}^+$  siguiendo el gradiente electroquímico (difusión simple y facilitada, transporte pasivo), hay otros canales de  $\text{Na}^+$  voltaje- dependientes, que sólo se abren cuando la célula se despolariza (debido a alguna señal externa) (transporte activo) (ver *Fig.17*). Cuanto más se despolarice la célula, mayor número de estos canales se abrirán: se produce una retroalimentación positiva, lo que hace que el aumento de  $\text{Na}^+$  en el interior sea “explosivo”.





**Figura 17.** Tipos de transporte a través de la membrana celular. Transporte activo y pasivo son imprescindibles para el funcionamiento adecuado de la célula es diferentes procesos (Tomada de Curtis y Barnes, 2004 [8]).

Al abrirse los canales de  $\text{Na}^+$ , la célula se despolariza un poco (además sigue saliendo  $\text{K}^+$  que lo contrarresta), pero despolarizaciones pequeñas producen grandes aumentos de permeabilidad de  $\text{Na}^+$  (o sea, se abren más canales); cuando la despolarización sobrepasa un valor umbral, la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  aumenta lo suficiente para permitir que los iones  $\text{Na}^+$  entren más deprisa de lo que salen los iones de  $\text{K}^+$ , así la célula se despolariza más, se abren más canales y el ciclo se repite. La permeabilidad del  $\text{Na}^+$  aumenta muchísimo (unas mil veces) y se hace mayor que la permeabilidad del  $\text{K}^+$ . Esto hace que el potencial de membrana pase a ser de unos +50 mV en el pico de potencial de acción. Pronto la permeabilidad del  $\text{Na}^+$  disminuye y se restablecen nuevamente los valores de reposo, así la célula se repolariza. Hay dos procesos que repolarizan la membrana:

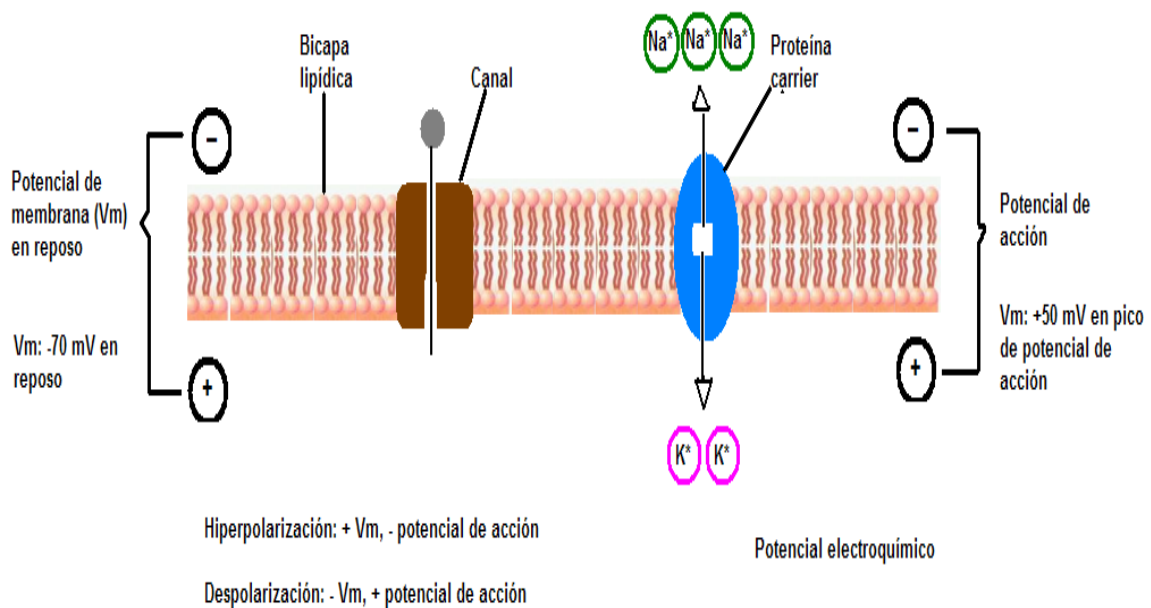
- Apertura de canales de  $\text{K}^+$  voltaje- dependientes. Se abren con la despolarización, pero con un cierto retraso
- Inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$

Existe un tiempo entre dos potenciales de acción en el que la célula es inexcitable, llamado periodo refractario, el cual puede ser absoluto (excitación imposible) o relativo (posible, pero se necesita una mayor despolarización, ya que la célula se encuentra ligeramente hiperpolarizada).

Si la despolarización no es suficiente para que la célula alcance el nivel umbral, los iones de  $\text{Na}^+$  no bastan para contrarrestar la salida de  $\text{K}^+$ , de forma que la despolarización no persiste y el potencial vuelve a su valor de reposo. Estos son los denominados *potenciales locales* que se dan por las propiedades de cable de las células, son pasivos, no se disipan y admiten sumación. Por el contrario, los potenciales de acción son activos, no se disipan y tienen una amplitud constante.

En el mantenimiento de las propiedades eléctricas de las células excitables es fundamental en el funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Gracias a ella se

mantiene el potencial de membrana y se produce repolarización después de cada potencial de acción (ver Fig.18). La cantidad de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  necesarios para producir un solo potencial de acción es de 3 pmoles/  $\text{cm}^2$  de membrana, lo que representa el movimiento de 2, 000, 000, 000, 000 de iones, cada canal puede transportar alrededor de 100, 000, 000 iones/ seg. Por lo tanto, para mantener la capacidad de generar potenciales de acción, las *baterías iónicas* deben ser recargadas continuamente por la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

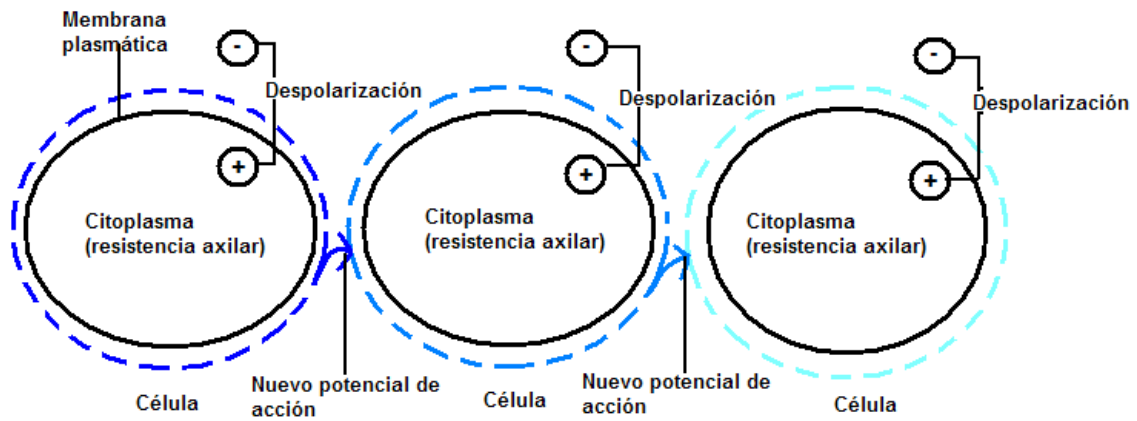


**Figura 18.** Potencial de membrana y potencial de acción. Dependen de los canales iónicos y de las proteínas *carrier* respectivamente. Está inmerso el potencial electroquímico, así como la hiperpolarización y despolarización.

#### Propagación del potencial de acción

Se ha descrito el mecanismo por el que se produce un potencial de acción en un punto de una membrana de una célula. Estos potenciales se propagan activamente a lo largo de la membrana plasmática: la corriente se propaga desde la región ocupada por el potencial de acción a la membrana adyacente, en donde se produce un nuevo potencial de acción. El flujo de corriente en el interior y exterior de la célula causa una despolarización de los puntos próximos de la membrana y, cuando se alcanza un umbral, aparece un nuevo

potencial de acción. La velocidad de propagación, denominada velocidad de conducción, está determinada, entre otras variables, por la resistencia del citoplasma (resistencia axilar) [9] (ver *Fig. 19*).



**Figura 19.** Propagación del potencial de acción de célula a célula. A través de la membrana plasmática se propaga el nuevo potencial de acción al punto más cercano de la siguiente membrana plasmática de la siguiente célula.

## 2.1.-ANTECEDENTES GENERALES

En 1996 Cho y colaboradores se enfocaron el estudio de reorganización de la estructura de microfilamentos en células Hep3B (hepatoma humano), aplicando CMs variados con frecuencias de 1 a 120 Hz, con un tiempo que iba de 1 a 60 minutos. Ellos observan que de 1 a 10 Hz se provoca la reorganización de microfilamentos de forma continua en dirección al campo expuesto; en contraste, la estructura de microfilamentos en células expuestas de los 20 a los 120 Hz no difieren del comportamiento de las células control, microfilamentos que se alinearon de forma paralela al campo expuesto. Concluyen que los CMs son capaces de inducir una redistribución del receptor de la cara celular, influenciada por el calcio y síntesis de proteínas y de DNA. Esta redistribución está adecuadamente explicada por el mecanismo de electroósmosis, el cual causa que la célula se vaya hacia el polo negativo del campo aplicado, sin embargo, la electroósmosis no es suficiente para explicar la redistribución de los receptores [10].

Bartsch y sus colegas en el 2002 evaluaron la señal de telefonía móvil “Group Special Mobile” (GSM) de frecuencia de 900 MHz sobre tumores mamarios en ratas. Les indujeron dichos tumores a ratas hembras Sprague- Dawley usando el 7,12 dimetilbenza-antraceno (DMBA) como modelo de cáncer en humano. Realizaron el experimento con tres repeticiones anuales bajo las mismas condiciones estandarizadas y realizados el mismo día durante tres años consecutivos. Los CMs fueron aplicados continuamente durante 278 días a las ratas experimentales y se mantuvieron los controles durante 145 días. En los resultados observaron que no hubo diferencia estadísticamente significativa a la exposición sobre la latencia del tumor y la incidencia acumulativa del tumor al final del experimento. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el primer experimento con respecto a los controles, lo que no se observó en la segunda ni tercera repetición. Los resultados mostraron que los CMs no parecen estar involucrados en los efectos promotores de cáncer o carcinogénicos sobre el DMBA inducido. Para explicar la razón, una de sus hipótesis se basa en los mecanismos de control neuroendocrinos involucrados en la promoción de los tumores mamarios inducidos por DMBA [11].

Kirson y sus colegas en el 2004 encontraron que al utilizar CMs alternados de frecuencias intermedias de 100 y 300 KHz durante 24 horas tienen un profundo efecto inhibitorio sobre una variedad de líneas de células tumorales humanas, de roedores y de células tumorales malignas inoculadas en animales (Patricia C, U-118, U- 87, H-1299, MDA 231, PC3, B16F1, F-98, C-6, RG2, C57BL/6 y BALB/c y CT-26). Ambas frecuencias fueron inducidas en cultivos *in vitro* y la frecuencia de 100 KHz se indujo a ratones experimentales con tumores inoculados de la línea celular C57BL/6 y BALB/c. Sus observaciones mostraron que en los cultivos celulares experimentales se afectó la división celular, mientras que las células control permanecieron intactas; en las ratas experimentales se observó un crecimiento lento del tumor y una extensiva destrucción de células tumorales de tres a seis días. Mediante micrograbaciones del proceso de división de estas células identificaron dos posibles mecanismos por los cuales los campos eléctricos actúan: 1) efecto del campo sobre la orientación polar de la célula; relacionado con el proceso de ensamblaje y desensamblaje de MTs que es esencial para el alineamiento y separación de los cromosomas y, 2) cómo interfiere con la división de la célula y parece ser el más importante en la destrucción celular. Proponen que el mecanismo de destrucción de la división celular proviene de la distribución del campo electromagnético [12].

Por otro lado, en el 2005 Cucullo y colegas encontraron que alternando baja intensidad de CMs de frecuencia mucho más baja, cerca de 50 Hz, se pueden mantener algunas células sin división. Sin embargo, no saben cuál es exactamente el proceso por el cual sucede esto pero sugieren que el mecanismo involucra una proteína particular que forma poros en la membrana celular para transportar iones de  $K^+$  dentro de la célula [13].

Kirson y sus colegas en el 2007 trabajaron con líneas celulares de cáncer de seno MDA- MB- 231 y la línea celular de cáncer de pulmón H1299 así como con dos modelos de animales con melanoma intradérmico B16F1 y glioma intracraneal F-98, aplicaron electrodos implantados intradérmicos en los ratones, utilizando frecuencias de campos magnéticos de 200 KHz para estudiar los efectos de CMs sobre estas líneas cancerígenas. Observaron que las células control a las que no les aplicaron CMs se multiplicaban dos veces

más durante 24 horas, mientras que a las células a las que se habían aplicado la frecuencia de 200 KHz su ciclo celular era más lento. A partir de este estudio, comenzaron su primer tratamiento piloto en humanos, utilizando CMs en Glioblastoma Multiforme (GBM) que es un tipo de tumor cerebral con un índice muy bajo de supervivencia. Utilizaron a 10 pacientes que presentaban GBM y les aplicó electrodos que emitían la frecuencia de 200 KHz durante 18 horas por día por un periodo de 18 meses. Observan que hay progresión en 26 semanas y supervivencia de 62 semanas, mientras que con otros tratamientos hay progresión en 10 semanas y tiempo de supervivencia de 30 semanas. Tres de los 10 pacientes siguen con vida y dos ya no presentaron cáncer. Concluyen que el tratamiento con campos magnéticos es seguro y efectivo como una nueva modalidad de tratamiento, con la ayuda de radiaciones y quimioterapias [14].

De Paz y Rodríguez en 1996 trabajaron con frecuencias de 40 y 70 MHz para investigar la acción de CMs en el desarrollo de colaterales linfáticos en ratas blancas. Utilizaron 72 ratas de ambos sexos de las cuales 24 se consideraron como control y 48 como grupo experimental. Se provocaron los colaterales linfáticos con la extirpación quirúrgica bilateral de los linfonodos poplíteos. Después de cuatro días de la cirugía se les aplicaron los campos de las frecuencias ya mencionadas por 10 minutos durante 10 días. En sus resultados proponen que la reacción parece estar relacionada con la duración, la intensidad y la frecuencia con que se exponen los organismos vivos a este campo. No recomiendan la aplicación de CMs porque se aumenta el flujo sanguíneo y por ende, la diseminación de células cancerosas lo que causa metástasis [15].

En 2006 Pavicic y Trosic evaluaron la influencia de CMs de una frecuencia de 864 MHz sobre la proliferación, capacidad de formar colonia y la viabilidad en células cancerígenas de pulmón de la línea V79 tomadas de ratones chinos. Expusieron por una, dos y tres horas cultivos celulares durante un día con la frecuencia de 864 MHz. La proliferación se determinó por conteo celular por cada hora durante la exposición y posterior a ella durante cinco días seguidos. Para identificar la capacidad de formar colonia se determinó cada hora mediante observación y la viabilidad se determinó con azul de tripano. En sus

resultados observan y concluyen que a esta frecuencia solo se ve afectada la proliferación pero no la viabilidad ni la capacidad de formar colonia en las células V79. Elucidan un sofisticado mecanismo de acción celular donde se relacionan las radiofrecuencias con un nivel subcelular [16].

## **2.2 ANTECEDENTES PARA LA LÍNEA CELULAR CANCERÍGENA MCF-7**

Liburdy y colegas en 1993 trabajaron con CMs de frecuencia de 60 Hz para observar si esta frecuencia puede actuar a nivel celular para influenciar el crecimiento del estrógeno humano dependiente de células de cáncer de seno MCF-7. Trabajaron con tres experimentos sin melatonina, aplicando:  $1.90 \pm 0.01$ ,  $2.40 \pm 0.70$ ,  $2.53 \pm 0.50$  mG y tres experimentos con melatonina aplicando:  $10.4 \pm 2.12$ ,  $11.95 \pm 2.73$ ,  $11.95 \pm 3.28$  mG exponiéndolos a CMs de 60 Hz. Observan que no hubo proliferación en ausencia de melatonina. Con  $10^{-9}$  M melatonina hubo 18% de inhibición de crecimiento observado en el experimento de  $2.40 \pm 0.70$  mG, efecto bloqueado en el experimento de  $11.95 \pm 2.75$  mG, un 27% de inhibición en el experimento de  $2.53 \pm 5.50$  mG, efecto bloqueado en el experimento de  $11.95 \pm 3.28$  mG. Estos resultados proveen la primera evidencia de que la frecuencia de 60 Hz puede actuar a nivel celular aumentando la proliferación de cáncer de seno mediante bloqueo de la melatonina como acción oncostática natural. Los mecanismos no son conocidos pero pueden involucrar la modulación de señales de transducción asociados con la regulación de la melatonina [17].

Harland y Liburdy en 1997 realizaron un estudio aplicando también CMs de 60 Hz de frecuencia para investigar un posible efecto de mecanismo biológico de esta frecuencia sobre células MCF-7 aplicándoles el anti estrógeno tamoxifen para observar si hay una acción inhibitoria sobre el crecimiento. Se aplicó la frecuencia de 60 Hz durante 72 horas, homogenizando cajas Petri a la  $0.1 \times 10^5$  células, a las cuales se les aplicó tamoxifen y melatonina de la siguiente forma:

- 1) Controles n=12 de células sin tamoxifen ni melatonina
- 2) Experimento 2: n=5.  $10^{-8}$  M de melatonina con tamoxifen presentaron un 18% de inhibición

- 3) Experimento 3: n=12.  $10^{-7}$  M melatonina con tamoxifen presentan un 40% de inhibición
- 4) Experimento 4: n=5.  $10^{-6}$ M de melatonina con tamoxifen presentan un 68% de inhibición en crecimiento.

Observan que al aplicar CMs de esta frecuencia hay un efecto bloqueador sobre la melatonina y la función del tamoxifen [18].

Por otro lado, en el 2000 Loberg y colaboradores aplicaron la frecuencia de CMs de 60 Hz para determinar viabilidad y crecimiento en líneas de cáncer de seno expuestas a este campo. Se trabajó con tres líneas celulares receptoras positivas a estrógenos de cáncer de seno: MCF-7, ZR-75-1 y T-47D, una línea de cáncer de seno receptora negativa a estrógenos: MDA-MB-231, expuestas por 72 horas a 60 Hz. La viabilidad se determinó con el ensayo de sulfhodamina (SRB) a las cero y 72 horas. El crecimiento celular fue medido por el cambio de tinte del SRB después de las 72 horas dentro de las células. Concluyen que los CMs no provocaron efectos sobre la viabilidad o crecimiento en ningún tipo celular examinado. Por lo que sus resultados no apoyan la hipótesis de que los CMs estimulan el crecimiento de células de cáncer de seno [19].

Blackman y colaboradores en el 2001 aplicaron CMs de frecuencia de 60 Hz en células MCF-7 para determinar la influencia de esta frecuencia inducida sobre las células con melatonina y tamoxifen. Se trabajaron cultivos celulares con tamoxifen y, por otro lado, con melatonina así como células control con campo aplicado y sin campo durante siete días. Para caracterizar el número celular por día se utilizó el ensayo de hemocitometría el día siete para las células con melatonina y a las que se les aplicó tamoxifen se utilizó el ensayo de conteo alternativo en los días cuatro, cinco, seis y siete. Se realizaron tres repeticiones para los experimentos con melatonina y nueve repeticiones para las células con tamoxifen. Los resultados arrojan que el número celular de los experimentos con melatonina fue significativamente reducido (16.7%) después de siete días con respecto al control y, con la presencia de 60 Hz presentaba la misma cantidad celular que los controles. En los experimentos con tamoxifen hubo reducción de crecimiento celular de 18.6% para el día seis y 25% para el



día siete sin CMs. La población con CMs presentó reducción solo de 18.7 para el día seis y 13.1% para el día siete. Con este estudio comprueban lo dicho por Harland y Liburdy: con CMs de 60 Hz puede reducirse significativamente la acción inhibitoria de los niveles fisiológicos de la melatonina y los niveles farmacológicos del tamoxifen [20].

En la investigación de Ding y colaboradores en el 2001 trabajaron también con la frecuencia de CMs de 60 Hz en cultivos celulares de MCF-7 para evaluar la supresión transitoria de rayos X que conducen a apoptosis por exposición a frecuencia de CMs sobre la línea ya mencionada. Aplican la frecuencia en cultivos y para otros les adicionan los rayos X durante 72 horas. Se encontró que la exposición a 60 Hz por cuatro, ocho y 24 horas no tenía efecto sobre el ciclo celular. La inducción de CMs de 60 Hz no condujo a crecimiento celular y la expresión de p21 fue inducida por rayos X. Tampoco los CMs de 60 Hz inducen a apoptosis ni la expresión de *Bax* y *Bcl-2* (proteínas relacionadas a la apoptosis). Sin embargo al exponer las células a la frecuencia por 24 horas después de haber sido sometidas a radiación X, disminuye significativamente la apoptosis y la expresión de *Bax* pero, incrementa la expresión de *Bcl-2*. A las 72 horas se induce a apoptosis y no se observa la expresión de *Bax* y *Bcl-2*. Estos datos sugieren que la exposición de CMs a 60 Hz no tiene efectos sobre el crecimiento de MCF-7 pero puede suprimir transitoriamente los rayos X que inducen a apoptosis a través del incremento de *Bcl-2* y *Bax* [21].

En 1993 Johann y colegas evaluaron la influencia de CMs sobre la morfología y actividad mitocondrial de la línea celular de cáncer de seno MCF-7 que fueron expuestas a CMs de 20 Hz durante 12 horas al día. Después de seis días de aplicar los CMs, observaron con el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (ensayo MTT) que las células mostraron un incremento en la actividad mitocondrial. Mediante microscopia electrónica de exploración se indicó que hubo una intensificación de rizado de la membrana con respecto a los controles [22].

Laqué y colegas en el 2010 investigaron los efectos de CMs pulsantes de 25 Hz de frecuencia durante dos horas por día en un lapso total de tres días sobre

las células MCF-7 con metotrexato y la citotoxicidad que éste provoca. En sus resultados observan y concluyen que los CMs pulsantes no inducen la modulación de la acción del metotrexato sobre las células MCF-7 cuando éstas son expuestas a la frecuencia ya mencionada [23].

Por otro lado Supino y colaboradores en el 2001 investigaron los efectos de CMs magnéticos oscilantes con la frecuencia de 50 Hz sobre células MCF-7 y células humanas normales de fibroblastos en la estructura organizacional morfológica (citoqueratina, detección de actina, así como la proliferación, la capacidad de formar colonia y la viabilidad) en tiempos largos y cortos con un lapso de uno a cuatro días. En sus resultados no observan cambios en ninguno de los cuatro días de exposición el crecimiento ni la viabilidad de células, así como el número de colonias, el tamaño, la distribución de las mismas a lo largo del ciclo celular y, tampoco se vio modificada la morfología y la distribución intracelular de la cantidad de citoqueratina; similarmente no hubo modificación en la distribución de la actina y en el potencial proliferativo. Sugieren que a esta frecuencia de CMs no hay cambios sobre las células MCF-7 ni en las células normales de fibroblastos [24].

### **3.- JUSTIFICACIÓN**

- Diversos trabajos experimentales muestran resultados controversiales de la acción que ejercen los CMs de diferentes frecuencias sobre tejidos, cultivos celulares y múltiples tipos de cáncer.
- Existen pocos reportes que muestren la viabilidad de la línea celular MCF-7 como una función de la inducción de CMs de diferentes frecuencias de los rangos de dispersión  $\alpha$  y  $\beta$ .
- Este estudio busca observar la influencia de CMs en un barrido de seis frecuencias dentro de los rangos de dispersión  $\alpha$  y  $\beta$  sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7.

#### **4.-OBJETIVOS**

General.-

- Evaluar la influencia que tienen CMs no ionizantes de diferentes frecuencias de los rangos de dispersión  $\alpha$  y  $\beta$  sobre la viabilidad de células cancerígenas de la línea MCF-7 expuestas durante 24 horas.

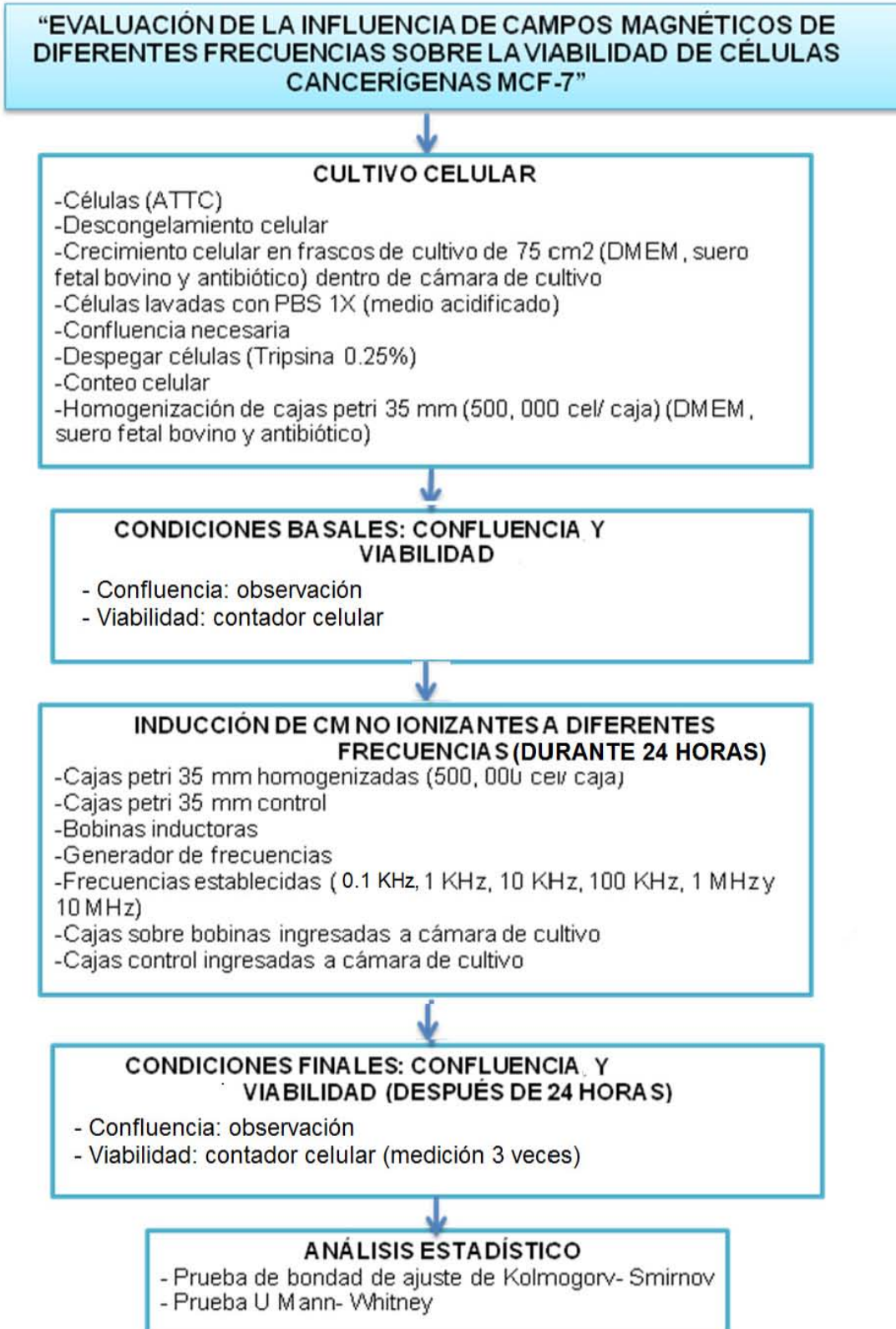
Particulares.-

- Estimar la confluencia de la línea celular de cáncer de seno MCF-7 después de 24 horas de exposición a CMs y observar si se ve afectada a frecuencias específicas.
- Estimar la viabilidad de la línea celular de cáncer de seno MCF-7 después de 24 horas de exposición a CMs y observar si se ve afectada a frecuencias específicas.

#### **5.- HIPÓTESIS**

- Los CMs no ionizantes de diferentes frecuencias tendrán efectos sobre el aumento o disminución de la viabilidad de células en cultivo de la línea celular de cáncer de seno MCF-7.

## DISEÑO EXPERIMENTAL



## **6.-MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1.- MATERIAL**

Ver Anexo 10.1

### **6.2.- MÉTODOS**

#### **6.2.1.-Cultivo celular**

Las células MCF-7 fueron adquiridas de la American Tissue Type Culture Collection (ATTCC) contenidas en crioviales con una cantidad aproximada de 800, 000 células. El material de cristal utilizado se esterilizó previamente en autoclave marca Forge, modelo STM- E durante 15 minutos, con 150 °C y una presión de 30 lb/in<sup>2</sup> (Ver Anexo 10.4). La campana de flujo laminar marca LABCONCO, modelo Class II (Ver anexo 10.4) se desinfectó con alcohol al 70% y se esterilizó con rayos UV durante cinco minutos ya que dentro de ésta las células previamente descritas se descongelaron y se pasaron a dos frascos de 75 cm<sup>2</sup> para mantenerlas en crecimiento en cultivo monocapa durante dos semanas y alcanzar una confluencia del 100%. Como medio de alimento para dichas células a los frascos de cultivo se les agregó medio DMEM con GlutaMAX marca Invitrogen Corporation, modelo de catálogo GIBCO 10569 (Ver Anexo 10.2) previamente preparado con Suero Fetal Bovino al 10% (SFB) marca Invitrogen Corporation, modelo de catálogo GIBCO 1600 (Ver Anexo 10.2) descomplementado (Ver Anexo 10.3) y con 500 µl de antibiótico (0. 25 µg/ ml de anfotericina) (Ver Anexo 10.3) por cada 50 ml de medio DMEM para evitar infecciones bacterianas y por micosis; se ingresaron los frascos a la incubadora de cultivo marca Forma Scientific, modelo 3159, que proporciona 37°C, y 5% de CO<sup>2</sup>. Cuando se observaba el medio acidificado (cambio de coloración de rojo a naranja o amarillo), se lavaron las células agregándoles dos veces 3 ml de buffer salino de fosfatos (PBS) al 1X (Ver Anexo 10.2) con una pipeta de 1 ml, cuidando que no se despegaran las células. Después de algunos días de tener la confluencia necesaria se despegaron las células agregándoles Tripsina al 0.25% durante 5 minutos con una pipeta de 1 ml, posteriormente se neutralizaba la Tripsina con 6 ml de medio DMEM pipeteando varias veces para conseguir una suspensión de células separadas individualmente. Después se llevaron a centrifugación con la centrífuga marca

Jouan, modelo BR4i (Ver Anexo 10.4), a 2100 revoluciones por minuto (rpm), durante 10 minutos; para poder homogenizar las cajas Petri de 35 mm que se utilizaron para aplicar los CMs a frecuencias determinadas, se realizó conteo celular con el contador celular automático marca Invitrogen (Ver Anexo 10.4) usando la técnica de azul tripano. Se ajustaron 24 cajas Petri con un total de 500, 000 cel/caja realizando cada experimento por duplicado ( $a_1$  y  $a_2$ ), por otro lado, también se tuvieron los controles por duplicado de la respectiva frecuencia ( $c_1$  y  $c_2$ ) agregando a todas las cajas medio DMEM preparado. Para asegurar la adherencia de las células al sustrato después de cuatro horas de homogenizadas las cajas, se aplicaron los CMs las frecuencias determinadas.

### **6.2.2.-Inducción de CMs no ionizantes a diferentes frecuencias**

El Departamento de Bioingeniería de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad desarrolló un arreglo de bobinas inductoras (Ver Anexo 10.4, *fig. 30*). Estas bobinas fueron construidas con alambre de magneto calibre 32 sobre una base cilíndrica de 3.5 cm de diámetro. Con un generador de frecuencias (Ver Anexo 10.4, *fig. 29*) se generaron los CMs a las frecuencias de 0.1 KHz, 1 KHz, 10 KHz, 100 KHz, 1 MHz y 10 MHz. Los experimentos por duplicado ( $a_1$  y  $a_2$ ) se colocaron sobre las bobinas inductoras para mantener a todas las células, junto con las cajas control, bajo las mismas condiciones de temperatura, oxígeno y CO<sub>2</sub>. Las cajas control se mantuvieron distantes de las bobinas inductoras para que no se expusieran a ningún tipo de cambios por los CMs generados.

### **6.2.3.- Condiciones Basales:**

#### **a) Confluencia**

La confluencia o capacidad para formar colonia celular se determinó por observación a microscopio invertido de luz (Ver Anexo 10.4, *fig. 32*). Después de cuatro horas de homogenizadas las cajas, la confluencia basal mínima considerada fue del 90%.

#### **b) Viabilidad**

La viabilidad celular se determinó por medio del contador celular automático.

#### **6.2.4 Condiciones finales (después de 24 horas de aplicados los CMs):**

##### **a) Confluencia**

La confluencia final se determinó observación a microscopio y se tomaron fotografías de cada caja Petri para confirmar los datos con una cámara digital marca NOKIA, modelo 5530, con 3.5 megapíxeles de resolución, tomadas a 40X del microscopio invertido marca Reichert- Jung (Ver Anexo 10.4, *fig.32*)

##### **b) Viabilidad**

Se despegaron las células de cada caja Petri con Tripsina al 0.25%, se pipeteo varias veces con una pipeta de 1 ml para conseguir una suspensión de células separadas individualmente, cuidando de no dañar las mismas. Las cajas experimentales por duplicado ( $b_1$  y  $b_2$ ) después de ser despegadas, se vertieron en un frasco Falcon de 50 ml y, por otro lado, las cajas control por duplicado ( $d_1$  y  $d_2$ ) se vertieron en otro frasco Falcon para ser centrifugadas a 2100 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se evaluó la viabilidad con el contador celular automático usando la técnica de azul tripano. Se realizó esta evaluación en tres campos diferentes con el contador celular automático y los valores se promediaron.

#### **6.2.5 Análisis estadístico**

Se obtuvieron las medidas de viabilidad y confluencia basales y finales, posteriormente se realizó la Prueba de bondad de ajuste de Kolmogorv-Smirnov; prueba no paramétrica para saber qué tan bien se ajustaba la distribución de los datos de cada muestra a una distribución normal.

Posteriormente se realizó la prueba de U Mann- Whitney- Wilcoxon no paramétrica de comparación de muestras independientes. El nivel de significancia estadística considerada fue de  $p < 0.05$ .

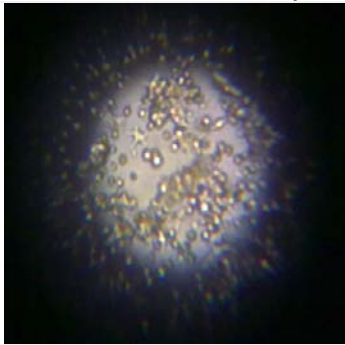

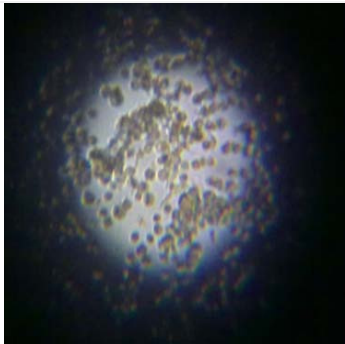
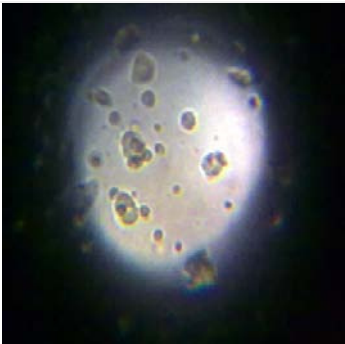

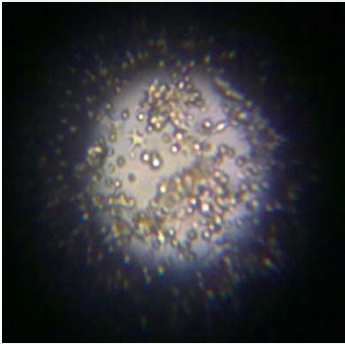
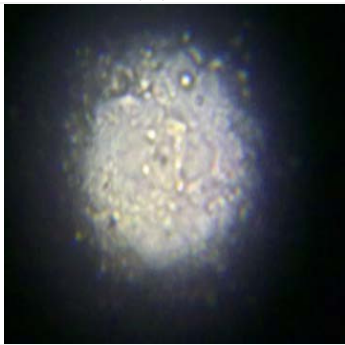
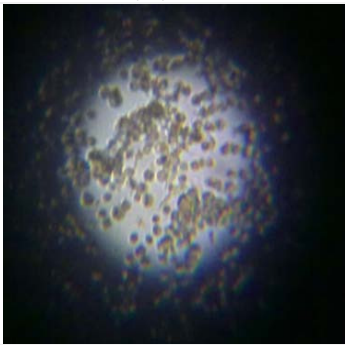


## **7.- RESULTADOS**

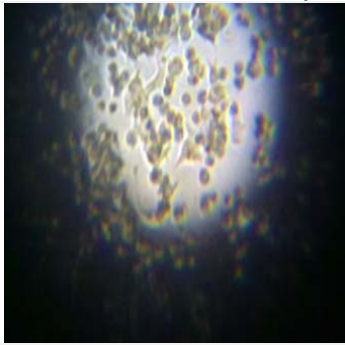
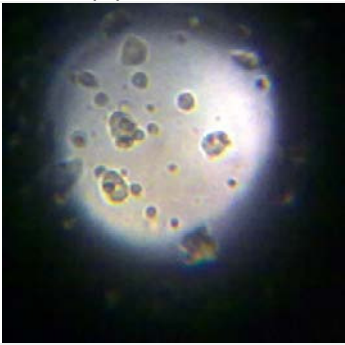
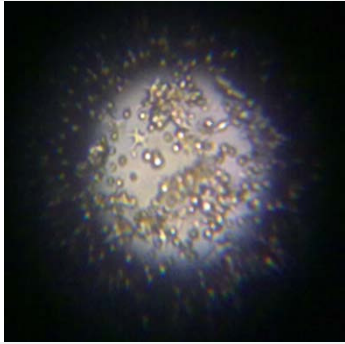
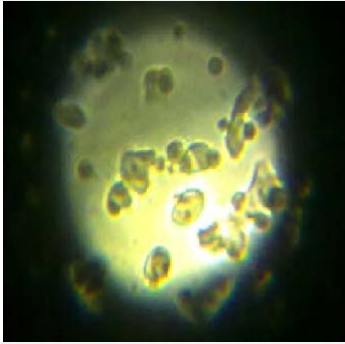
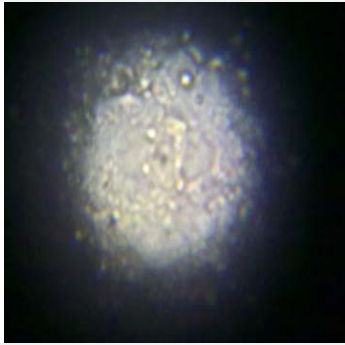
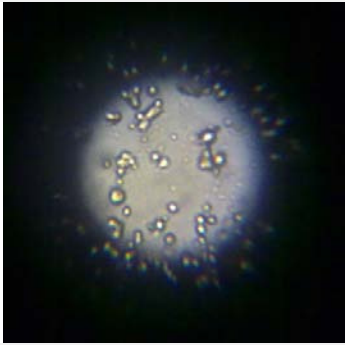
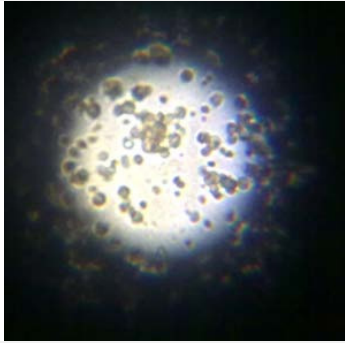
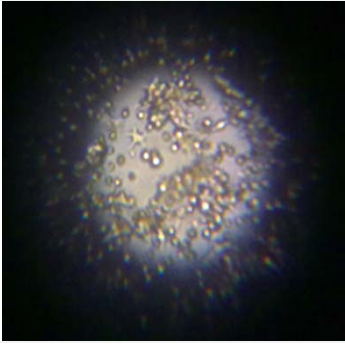
### **7.1 Confluencia**

En las *figuras 20-25* se muestran las fotografías de la confluencia basal y posterior a la inducción de CMs de seis diferentes frecuencias dentro de los rangos de dispersión  $\alpha$  y  $\beta$ . Se observa que la disminución mínima de confluencia fue de un 10% en los cultivos expuestos a la frecuencia de 10 KHz y la máxima disminución fue de un 44% en los cultivos expuestos a la frecuencia de 1 MHz con respecto a los cultivos basales. La disminución máxima observada en los cultivos control posterior a 24 horas fue de un 3% con respecto a la confluencia basal de los mismos.



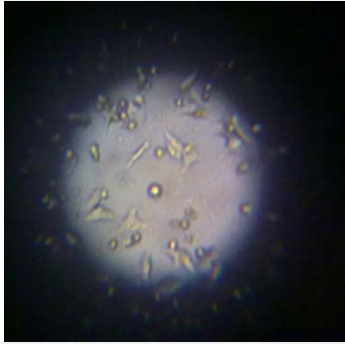

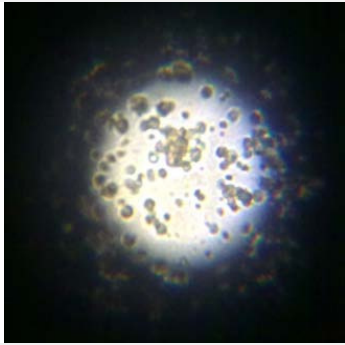
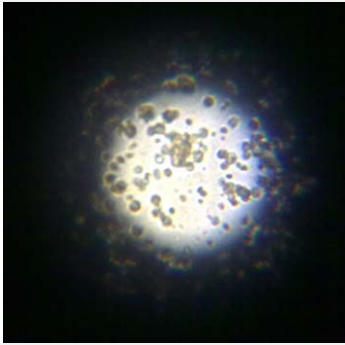
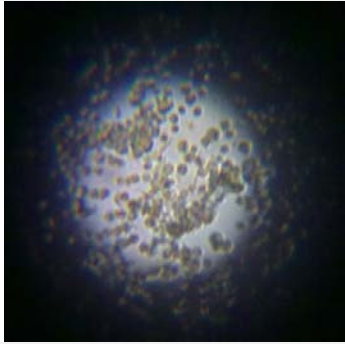
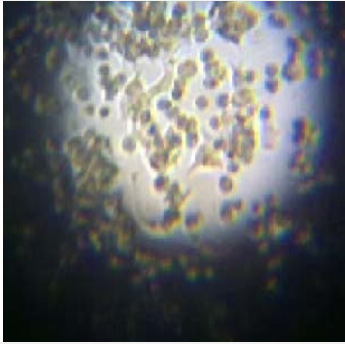
La *figura 26* muestra el gráfico de barras de confluencia basal (**a**) y posterior a las 24 horas de inducidos los CMs (**b**), en éste último se observan diferencias estadísticamente significativas al utilizar la prueba **U de Mann-Whitney-Wilcoxon** en todos los cultivos experimentales con respecto a los cultivos control.

Basal		t = 24 horas	
<i>Exposición a CMs, f = 0.1 Hz (α)</i>			
			
(a <sub>1</sub> ) 95%		(b <sub>1</sub> ) 75%	
			
(a <sub>2</sub> ) 97%		(b <sub>2</sub> ) 60%	
<i>Control</i>			
			
(c <sub>1</sub> ) 99%		(d <sub>1</sub> ) 99%	
			
(c <sub>2</sub> ) 99%		(d <sub>2</sub> ) 99%	

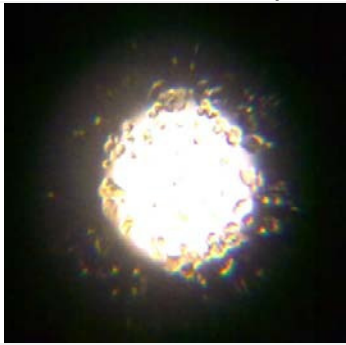
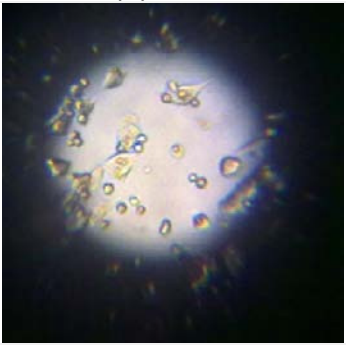
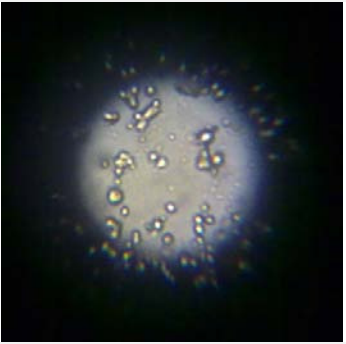

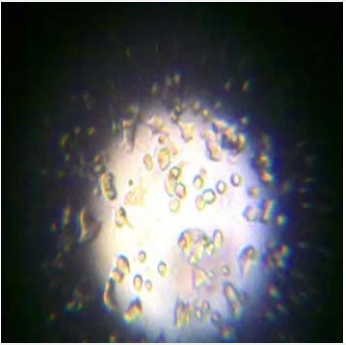
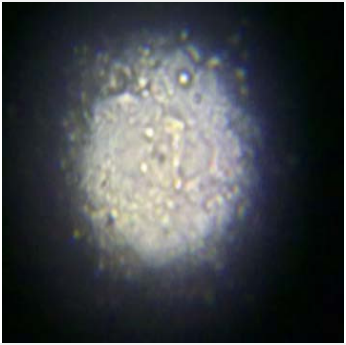
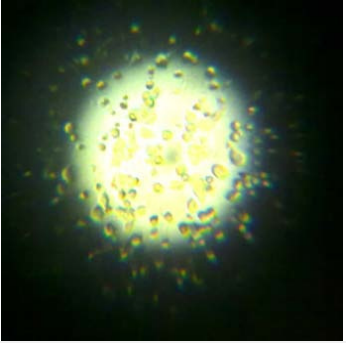
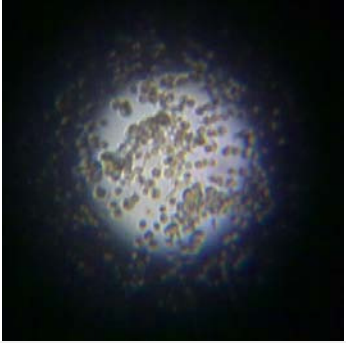
**Figura 20.** Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 0.1 KHz. Disminución de confluencia en un 20% y 37% en los cultivos experimentales expuestos a CMs (b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (a<sub>1</sub> y a<sub>2</sub>). La confluencia de los cultivos control no muestra cambios después de 24 horas (d<sub>1</sub> y d<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub>).

Basal	t = 24 horas
<i>Exposición a CM, f = 1 KHz (a)</i>	
	
(a <sub>1</sub> ) 98%	(b <sub>1</sub> ) 69%
	
(a <sub>2</sub> ) 99%	(b <sub>2</sub> ) 70%
<i>Control</i>	
	
(c <sub>1</sub> ) 99%	(d <sub>1</sub> ) 96%
	
(c <sub>2</sub> ) 97%	(d <sub>2</sub> ) 99%

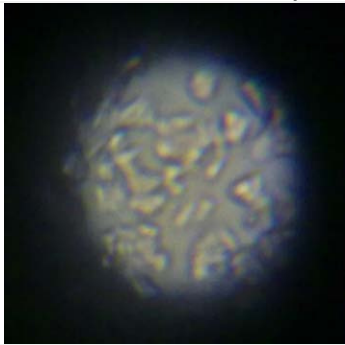
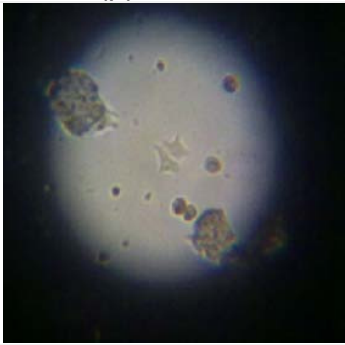
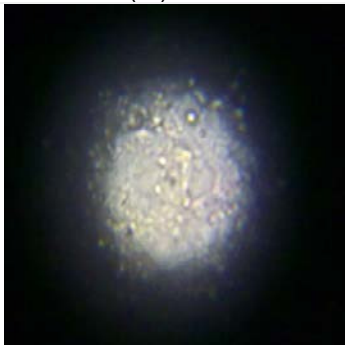
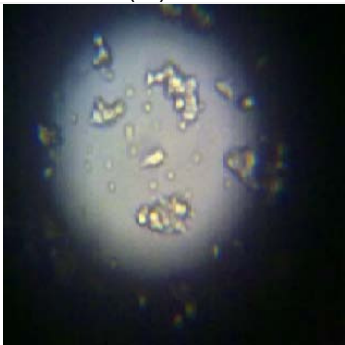
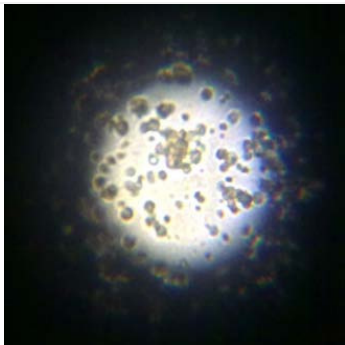
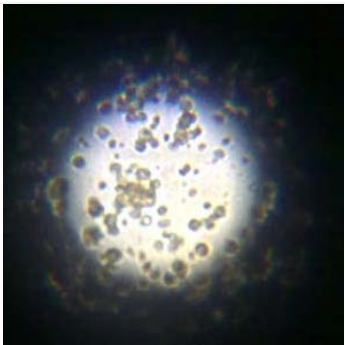
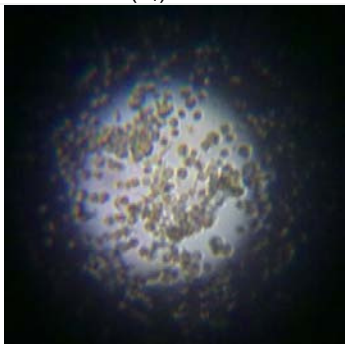
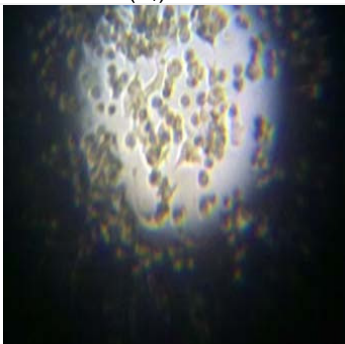
**Figura 21.** Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 1 KHz. Disminución de confluencia en un 29% en ambos cultivos experimentales expuestos a CMs (b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (a<sub>1</sub> y a<sub>2</sub>). La confluencia de los cultivos control disminuye en un 3% (d<sub>1</sub>) y aumenta en un 2% (d<sub>2</sub>) después de 24 horas con respecto a la confluencia basal (c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub>) respectivamente.

Basal	t = 24 horas
<i>Exposición a CMs, f = 10 KHz (a)</i>	
	
(a <sub>1</sub> ) 90%	(b <sub>1</sub> ) 75%
	
(a <sub>2</sub> ) 90%	(b <sub>2</sub> ) 80%
<i>Control</i>	
	
(c <sub>1</sub> ) 95%	(d <sub>1</sub> ) 97%
	
(c <sub>2</sub> ) 99%	(d <sub>2</sub> ) 99%

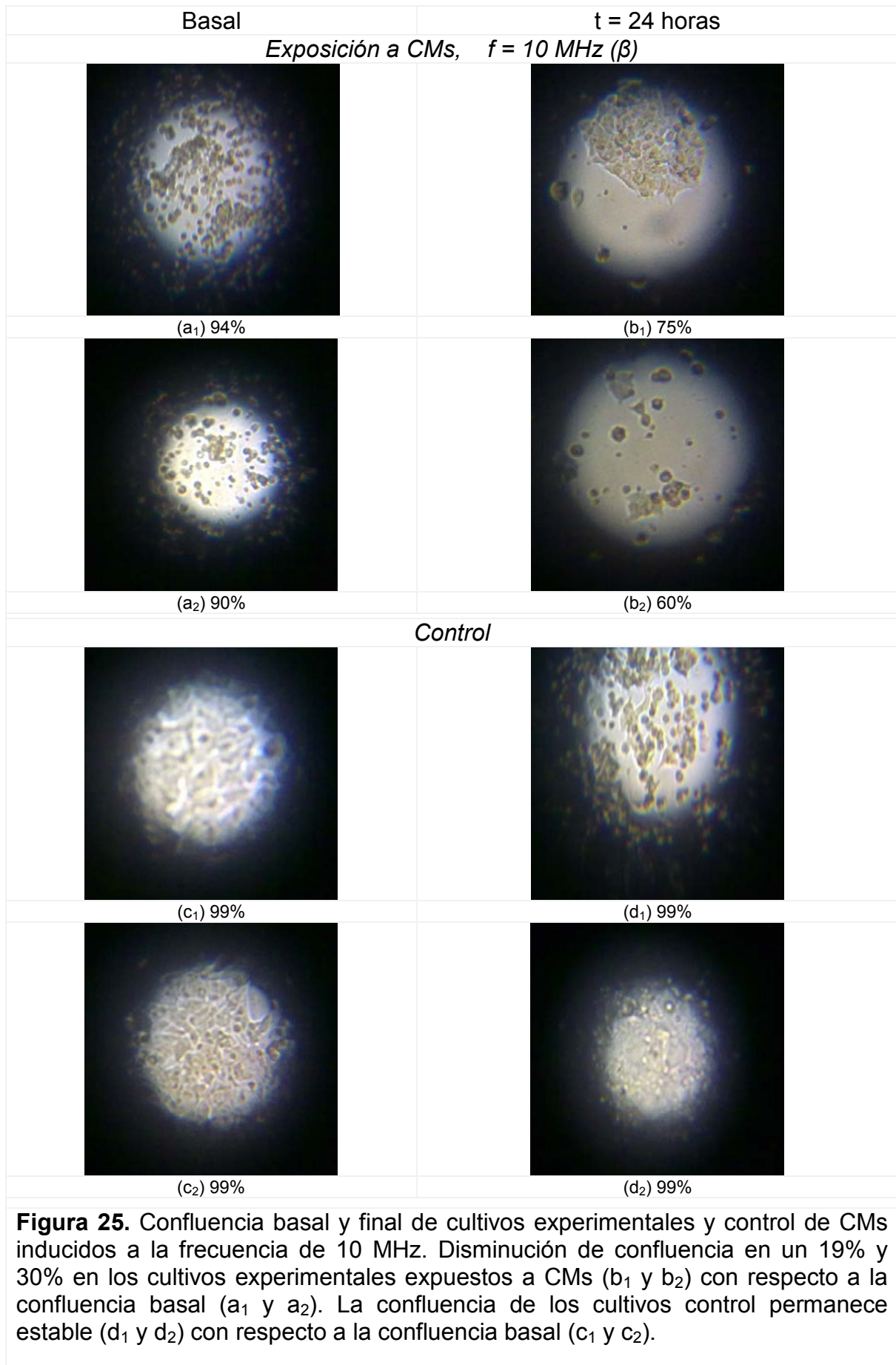
**Figura 22.** Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 10 KHz. Disminución de confluencia en un 15% y 10% en los cultivos experimentales expuestos a CMs (b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (a<sub>1</sub> y a<sub>2</sub>). La confluencia de los cultivos control disminuye en un 2% (d<sub>1</sub>) y permanece estable (d<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub>) respectivamente.

Basal	t = 24 horas
<i>Exposición a CMs, f = 100 KHz (<math>\alpha</math>)</i>	
	
(a <sub>1</sub> ) 90%	(b <sub>1</sub> ) 76%
	
(a <sub>2</sub> ) 90%	(b <sub>2</sub> ) 60%
<i>Control</i>	
	
(c <sub>1</sub> ) 95%	(d <sub>1</sub> ) 95%
	
(c <sub>2</sub> ) 96%	(d <sub>2</sub> ) 95%

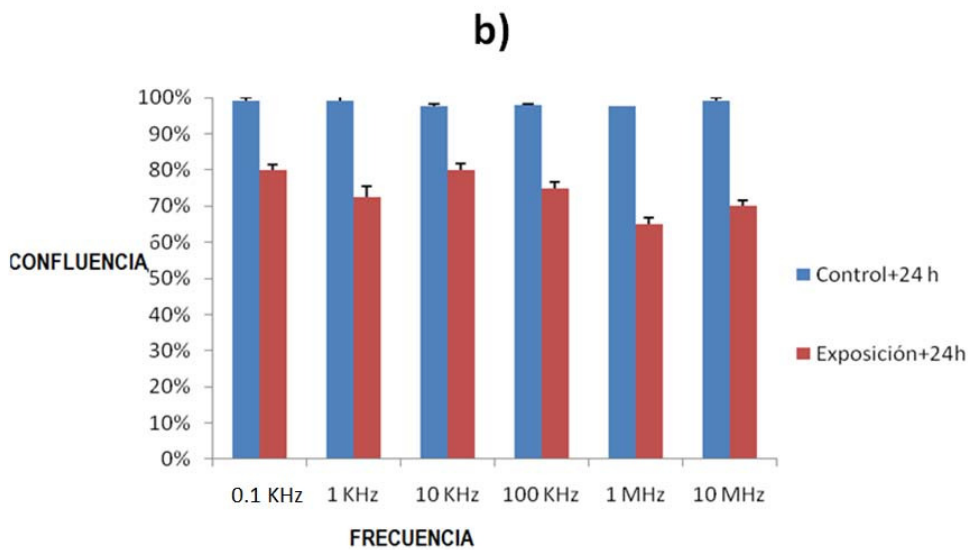
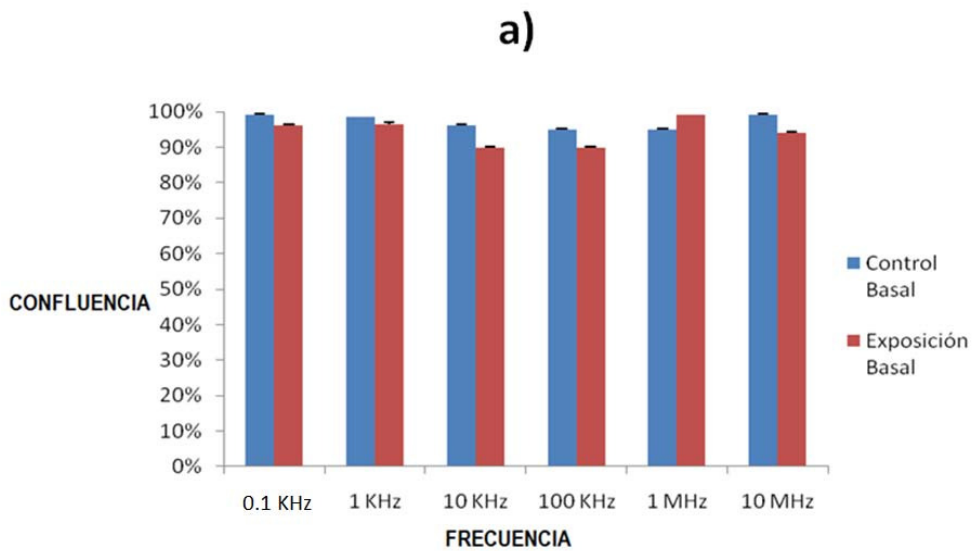
**Figura 23.** Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 100 KHz. Disminución de confluencia en un 14% y 30% en los cultivos experimentales expuestos a CMs ( $b^1$  y  $b^2$ ) con respecto a la confluencia basal ( $a^1$  y  $a^2$ ). La confluencia de los cultivos control permanece estable ( $d^1$ ) y disminuye 1% ( $d^2$ ) con respecto a la confluencia basal ( $c^1$  y  $c^2$ ) respectivamente.

Basal		t = 24 horas
<i>Exposición a CMs, f = 1 MHz (<math>\beta</math>)</i>		
		
(a <sub>1</sub> ) 99%		(b <sub>1</sub> ) 55%
		
(a <sub>2</sub> ) 99%		(b <sub>2</sub> ) 60%
<i>Control</i>		
		
(c <sub>1</sub> ) 95%		(d <sub>1</sub> ) 95%
		
(c <sub>2</sub> ) 97%		(d <sub>2</sub> ) 97%

**Figura 24.** Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 1 MHz. Disminución de confluencia en un 44% y 39% en los cultivos experimentales expuestos a CMs (b<sub>1</sub> y b<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (a<sub>1</sub> y a<sub>2</sub>). La confluencia de los cultivos control permanece estable (d<sub>1</sub> y d<sub>2</sub>) con respecto a la confluencia basal (c<sub>1</sub> y c<sub>2</sub>).







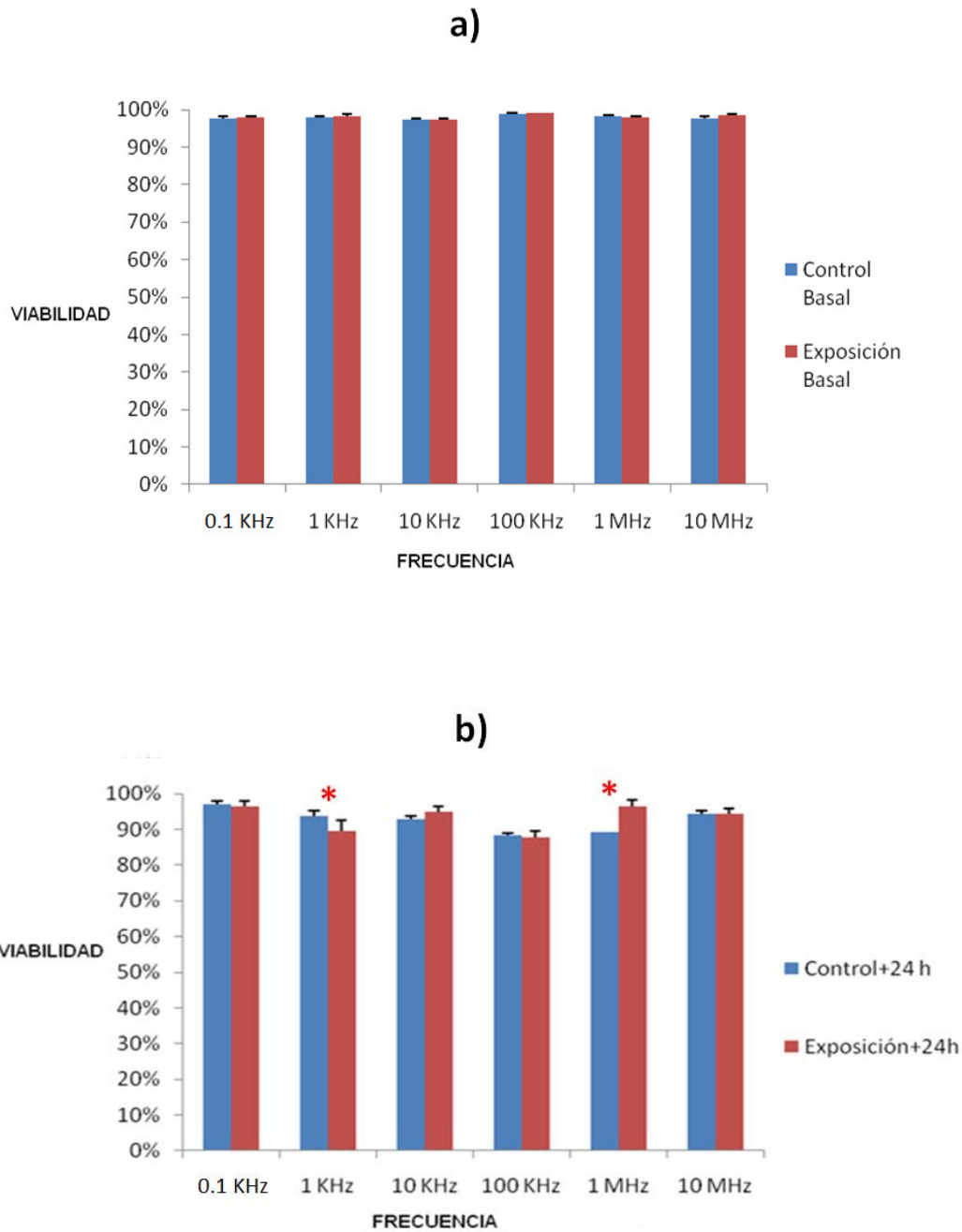
**FIGU**

**RA 26. a)** Gráfica de la confluencia promedio basal y **b)** posterior a 24 horas para cultivos control y expuestos a CMs de seis frecuencias diferentes. Se muestra el valor promedio y desviación estándar correspondiente a cada frecuencia. Una prueba **U de Mann-Whitney-Wilcoxon** para muestras independientes arrojó diferencias estadísticamente significativas para los valores de confluencia estimada posterior a 24 horas entre los cultivos control y los expuestos a CMs a todas las frecuencias.

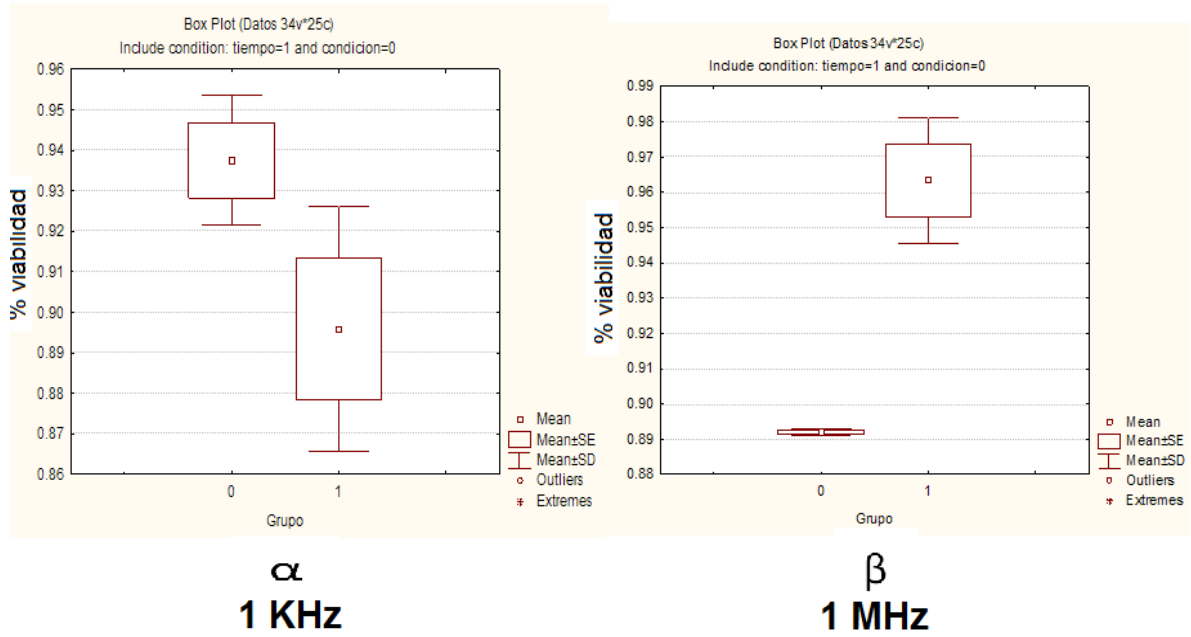
## 7.2 Viabilidad

La *figura 27* muestra los gráficos de barras de viabilidad observada en los cultivos control y de exposición en condiciones basales (**a**), donde se observa una viabilidad mínima aproximada del 99% en todos los casos. El gráfico de barras de viabilidad posterior a 24 horas de haber sido inducidos los CMs a las seis diferentes frecuencias (**b**) muestra cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en las frecuencias de 1 KHz y 1 MHz, donde se observa una disminución y un aumento con respecto a los cultivos control respectivamente.

La *figura 28* muestra el diagrama de cajas que evidencia una disminución de aproximadamente el 4% de viabilidad de los cultivos expuestos a CMs a la frecuencia de 1 KHz ( $\alpha$ ) y un aumento de aproximadamente 7% de viabilidad de los cultivos expuestos a CMs a la frecuencia de 1 MHz ( $\beta$ ) con respecto a los cultivos control.



**FIGURA 27. a)** Gráfica de viabilidad celular promedio basal y **b)** posterior a 24 horas para cultivos control y expuestos a CMs de seis frecuencias diferentes. Se muestra el valor promedio y desviación estándar correspondiente a cada frecuencia. Una prueba **U de Mann-Whitney- Wilcoxon** para muestras independientes arrojó diferencias estadísticamente significativas para los valores de viabilidad celular estimados posterior a 24 horas (b) entre los cultivos control y los expuestos a CMs a las frecuencias de 1KHz y 1MHz ( $p < 0.05$ ).



**Figura 28.** Diagramas de cajas que muestran valores promedio, error y desviación estándar del porcentaje de viabilidad celular registrados posterior a 24 horas para los cultivos control (Grupo 0) y expuestos a CMs (Grupo 1) a las frecuencias de 1 KHz y 1 MHz. La prueba **U de Mann–Whitney- Wilcoxon** para muestras independientes arrojó diferencias estadísticamente significativas. Obsérvese que tales frecuencias están centradas en segmentos de dispersión diferentes ( $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente) (ver *figura 5*) [5].

## **10.-ANEXOS**

### **10.1.- ANEXO DE MATERIAL**

- Frascos de cultivo de 75 cm<sup>3</sup>
- Cajas Petri de 35 mm
- Pipetas de 15 ml
- Tubos Falcon de 50 ml
- Matraz Erlenmeyer de 1 Lit.
- Malla de filtrado de 2 micras
- Frascos de 500 ml y de 1 Lit. esterilizados
- Alcohol al 70%
- Gasas
- Portaobjetos con cámaras para lectura del contador celular
- Micropipetas de 200 µl, 100 µl y 20 µl
- Puntas para micropipetas

## 10.2.- ANEXO DE SOLUCIONES

- PBS sin calcio 10X

Cloruro de Sodio (NaCl)	58.4g
Cloruro de potasio (KCl)	74.6g
Fosfato de Hidrógeno Disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	141.9g
Fosfato Diácido de Potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	136.1g

Se prepara para 80 ml de agua. Se ajusta el pH a 7.4 con Hidruro de Sodio (HNa). Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

- EDTA

372.2g → 1Lit. de agua = 1M

186.1g → 500 ml = 1M

x= 93.05g → 500ml = .5M

Se aumenta el pH a 8 con Hidróxido de Sodio (NaOH).

- Solución de Verseno

NaCl	8g
KCl	0.4g
EDTA (pH 8)	0.4g
Tris base	3.04mg

Se utiliza el EDTA preparado previamente.

- Tripsina al 0.25% con EDTA .5mM

Para el EDTA:

$$C1V1 = C2V2$$

$$(1\text{mM})(x) = (.5 \text{ mM}) (300\text{ml})$$

$x = 150\text{ml} \rightarrow$  esto es que en 300ml se agregan los 150ml para que quede a una concentración de .5 mM de EDTA

Para la Tripsina:

.25g de tripsina          100ml

X= .75g                      300ml

- Medio DMEM (marca Invitrogen Corporation modelo de catálogo GIBCO 10569) con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% (marca Invitrogen Corporation, modelo de catálogo GIBCO 1600) y anfotericina (50ml)

Para DMEM con SFB AL 10%:

50ml  $\rightarrow$  100%

X= 5ml                  10% esto es que en 45ml de medio DMEM, se afora con 5ml de SFB que queda en 10%

Para la Anfotericina

1ml= 1000 $\mu$ l de antibiótico

100X          1ml antibiótico 100X  $\rightarrow$  100ml de medio  $\rightarrow$  1X

$x = 0.5\text{ml} \rightarrow$  50ml de medio

### 10.3.-ANEXO DE PROCEDIMIENTOS

- Suero Fetal Bovino (marca Invitrogen Corporation, modelo de catálogo GIBCO 1600) descomplementado:

Se calienta a baño María a 60°C para su descongelamiento. Se deja por 30 minutos a esta temperatura y se alicuotiza en tubos Falcón de 50ml etiquetados rotulados (fecha, solución y número de tubo).

- Calibración del contador celular:

Se prepara la muestra blanco (1:1) con 10 µl de PBS 1X con 10 µl de azul tripano. En el menú del contador celular se selecciona SETTINGS y se da click CALIBRATION al .4%.

- Conteo celular:

Ya centrifugada la muestra se quita el sobrenadante y se mezcla con 2ml del mismo sobrenadante. Se toman 10 µl de la mezcla y se colocan en el portaobjetos. Se inserta en la ranura del contador celular y a éste se le da click en COUNT. Arroja resultados de células totales, células vivas, células muertas y viabilidad total.



## 10.4.-ANEXO DE EQUIPOS

- Generador de funciones: Emite las señales a las frecuencias seleccionadas (Marca HP, modelo 8116<sup>a</sup>, frecuencia máxima de 50 MHz).



**Figura 29.** Generador de funciones.

- Bobinas inductoras: alambre de cobre que junto con algún material, permite el pase de los CMs (Diseñadas por el Departamento de Bioingeniería de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad).



**Figura 30.** Bobinas inductoras.

- Estufa de cultivo: mantiene células para su supervivencia y crecimiento bajo las condiciones necesarias de temperatura y CO<sub>2</sub>. (Marca Forma Scientific. Proporciona 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C).
- Contador celular: proporciona la cantidad total de células en 1 mililitro, total de células vivas y viabilidad (%) (Countess automated cell counter. Marca Invitrogen).

Fundamento: la técnica de azul tripano: células vivas/ células muertas. Las células muertas retienen el colorante por los cambios intracelulares y las células vivas son selectivas al paso de sustancias.

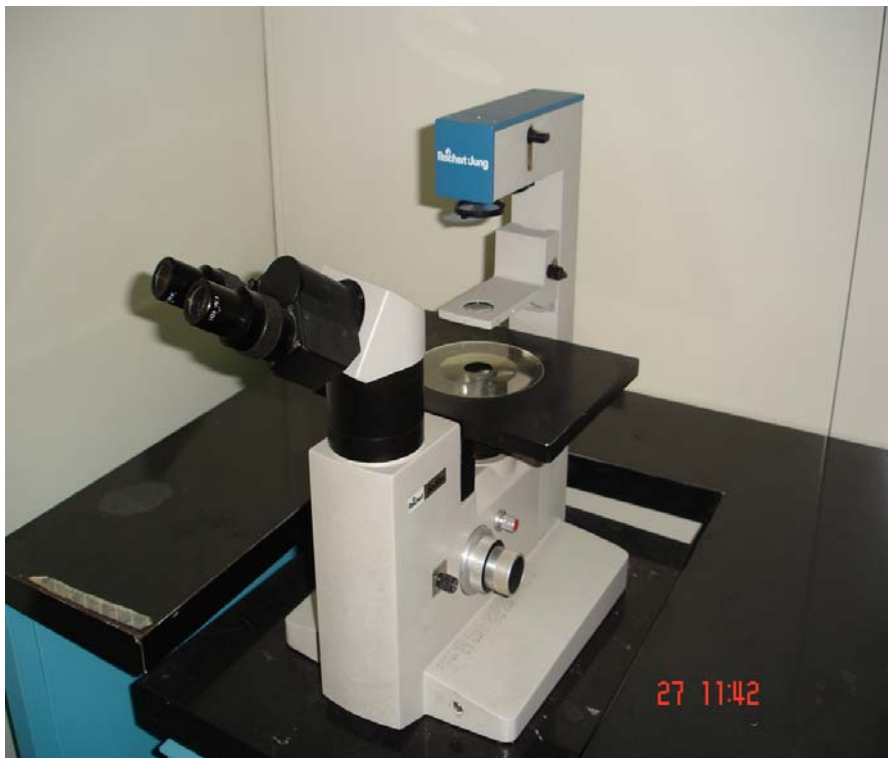


**Figura 31.** Contador celular automático.

- Centrífuga: separa las partículas de una solución de acuerdo a su tamaño, densidad, textura, viscosidad del medio y velocidad del rotor. Capacidad para centrifugar 6 tubos Falcon de 50 ml. (Marca Jouan, modelo BR4i).

Fundamento: la gravedad está relacionada con el efecto de separación que provoca en las partículas.

- Celular NOKIA: celular utilizado en este estudio para la toma de fotografías de confluencia basal y final. 3.5 megapíxeles de resolución (Marca TELCEL, modelo NOKIA 5530).
- Microscopio invertido de luz: permite observar muestras de organismos o tejidos en cultivo sin una preparación previa, favoreciendo el seguimiento del estado de crecimiento, comportamiento y demás patrones involucrados en el desarrollo de cultivo. El objetivo más potente usado para este estudio fue de 40X (Marca Reichert- Jung).



**Figura 32.** Microscopio invertido de luz.

- Autoclave de laboratorio: esteriliza material tanto líquido como sólido (matraces, propipetas, vasos de precipitado, etc.) cuenta con tiempo máximo de 60 minutos, a 150° C y una presión de 30 lb/in<sup>2</sup> (Marca Market Forge, modelo STM-E).
- Campana de flujo laminar: diseñada para permitir el control de algunas variables del ambiente físico.

## **11.- INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Etiopatogenia del cáncer de mama [3].	<b>5</b>
Tabla 2. Clasificación histopatológica del cáncer de mama [3].	<b>5</b>
Tabla 3. RNI según el tramo del espectro* [2].	<b>9</b>
Tabla 4. Tipo de dispersión para frecuencias específicas y los cambios celulares que provocan [5].	<b>11</b>

## **12.- INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Proceso de Carcinogenicidad.	<b>4</b>
Figura 2. Modelo de sistema multicelular aplicando un CM.	<b>11</b>
Figura 3. Gráfica de tipos de dispersión celular.	<b>13</b>
Figura 4. Paso de corrientes en las células por la inducción de CMs de bajas y altas frecuencias (HF y LF).	<b>14</b>
Figura 5. Etapas del ciclo celular.	<b>16</b>
Figura 6. Profase.	<b>17</b>
Figura 7. Prometáfase.	<b>18</b>
Figura 8. Los cuatro tipos de MTs del huso mitótico.	<b>19</b>
Figura 9. Metafase.	<b>19</b>
Figura 10. Anafase.	<b>21</b>
Figura 11. Telofase.	<b>21</b>
Figura 12. Citocinesis.	<b>23</b>
Figura 13. Constitución de los cromosomas para la mitosis.	<b>24</b>
Figura 14. Proteínas que intervienen en la polimerización de la tubulina	<b>25</b>
Figura 15. Separación de cromátidas por ubiquitinación.	<b>27</b>
Figura 16. Configuración de la proteína <i>carrier</i> : las dos formas alternativas permiten que se lleve a cabo la Bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+$	<b>29</b>
Figura 17. Tipos de transporte a través de la membrana celular	<b>31</b>
Figura 18. Potencial de membrana y potencial de acción.	<b>33</b>
Figura 19. Propagación del potencial de acción de célula a célula.	<b>34</b>

Figura 20. Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 0.1 KHz.	<b>50</b>
Figura 21. Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 1 KHz.	<b>51</b>
Figura 22. Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 10 KHz.	<b>52</b>
Figura 23. Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 100 KHz.	<b>53</b>
Figura 24. Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 1 MHz.	<b>54</b>
Figura 25. Confluencia basal y final de cultivos experimentales y control de CMs inducidos a la frecuencia de 10 MHz.	<b>55</b>
Figura 26. <b>a)</b> Gráfica de la confluencia promedio basal y <b>b)</b> posterior a 24 horas para cultivos control y expuestos a CMs de seis frecuencias diferentes.	<b>56</b>
Figura 27. <b>a)</b> Gráfica de viabilidad celular promedio basal y <b>b)</b> posterior a 24 horas para cultivos control y expuestos a CMs de seis frecuencias diferentes.	<b>58</b>
Figura 28. Diagramas de cajas que muestran valores promedio, error y desviación estándar del porcentaje de viabilidad celular registrados posterior a 24 horas para los cultivos control (Grupo 0) y expuestos a CMs (Grupo 1) a las frecuencias de 1 KHz y 1 MHz.	<b>59</b>
Figura 29. Generador de frecuencias.	<b>68</b>
Figura 30. Bobinas inductoras.	<b>68</b>
Figura 31. Contador celular automático.	<b>69</b>
Figura 32. Microscopio invertido de luz.	<b>70</b>

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Paredes a. Diagnóstico de los padecimientos de la glándula mamaria. 1era ed. Editorial Editores de Textos Mexicanos. 2008
- [2] García SI. La salud humana y los Campos Electromagnéticos de Frecuencia Extremadamente Baja (CEM- FEB). Informe final. Argentina: Asociación Toxicológica Argentina (Arg); 2005 Abril.
- [3] Elías S, Contreras A, Llanque C. Cáncer o carcinoma de mama. Rev Pacea Med Fam 2008. 5(7): 14-23.
- [4] Dolinsky C, Hill C. editores. Cáncer del seno (mama): Los fundamentos. Abramson Cancer Center of Pennsylvania; 2008.
- [5] Grimnes S, Martinsen OG. Bioimpedance & Bioelectricity BASICS. 1era ed. Editorial Academic Press. 2000.
- [6] Heres ME, Castañeda AN. Flujo de la información genética. Procesos postraduccionales, ciclo celular, mitosis y meiosis. 1era ed. UNAM FES Izatacala. 2009. (Pt 2).
- [7] Lomanto LD, Ortiz OL, Bretón CO, Gómez AI, Mesa VM. El ciclo celular. Rev MEDUNAB 2003. 6(16): 21-29.
- [8] Curtis H, Barnes SN. Biología. 6ta ed. 5ta reimp. Editorial Médica Panamericana. 2004.
- [9] Mariño, X. Fisiología general. Tema 3: potencial de membrana y potencial de acción. Documentación de asignaturas impartidas en la UDC. 2009- 2010. [www.culturacientifica.org/textos\\_udc.html](http://www.culturacientifica.org/textos_udc.html)
- [10] Cho MR, Thatte HS. Reorganization of microfilament structure induced by ac electric fields. Rev FASEB Journal 1996. 10: 1552- 1558.
- [11] Bartsch H, Bartsch C, Seebald E, Deeberg F, Dietz K, Vollrath L, Mecke D. Chronic exposure to a GSM- like signal (mobile phone) does not stimulate the development of DMBA- induced mammary tumors in rats: results of three consecutive studies. Radiat Res 2002. 157: 183-90.
- [12] Kirson ED, Zoya G, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. Cancer Res 2004. 64: 3288-3295.
- [13] Cucullo L, Dini G, Hallene KL, Fazio V, Ilkanich EV, Igboechi C, Kight KM, Agarwal MK, Garrity- Moses M, Janigro D. Very low intensity alternating current decreases cell proliferation. Glia 2005. 51:65- 72.



- [14] Kirson DE, Giladi M, Gurvich Z, Itzhaki A, Mordechovich S, Schneiderman RS, Wasserman Y, Ryffel B, Goldsher D, Palti Y. Alternating electric fields (TFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007. 104 (24): 10152- 10157.
- [15] De Paz, H, Benet M. ¿Debe emplearse magnetoterapia en el tratamiento del cáncer? *Rev Onco* 1996. 12 (2).
- [16] Pavicic I, Trosic I. Influence of 864 MHz electromagnetic field on growth kinetics of established cell line. *Biol Brat* 2006. 61 (3):321-325.
- [17] Liburdy RP, Sloma TR, Sokolic R, Yaswen P. ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER<sup>+</sup> breast cancer proliferation. *Pin Res Journal* 1993. 14(2): 89-97.
- [18] Harland J, Liburdy R. Environmental fields inhibit the antiproliferative action of tamoxifen and melatonin in human breast cancer cell line. *Bio Res* 1997. 18: 555- 562.
- [19] Loberg L, Endhal W, Gauger J, McCormick D. Cell viability and growth in a battery of human breast cancer cell lines exposed to 60 Hz magnetic fields. *Rad Res* 2000. 153, 725-728.
- [20] Blackman CF, Benane SG, House DE. The influence of 1.2  $\mu$ T; 60 Hz Magnetic Fields on melatonin- and- tamoxifen- induced inhibition of MCF-7 cell growth. *Bio Res* 2001. 22: 122-128.
- [21] Ding GR, Nakahara T, Tian FR, Guo Y, Miyakoshi J. Transient suppression of X- Ray- induced apoptosis by exposure to power Frequency magnetic fields in MCF-7 cells. *Bioch Biophys Res* 2001. 286(5): 953-957.
- [22] Johann S, Lederer T, Mikorey S, Kraus W, Blümel G. Influence of electromagnetic fields on morphology and mitochondrial activity of breast cancer cell line MCF-7. *Bioch Biophys Res* 1993. 30: 127-132.
- [23] Laqué E, Ruiz, MJ, Peña L, Gil L, Martínez M. Methotrexate cytotoxicity on MCF-7 breast cancer cells is not altered by exposure to 25 Hz, 1.5 mT magnetic field and iron (III) chloride hexahydrate. *Bio Res* 2010. 31(3): 237-245.
- [24] Supino R, Bottone MG, Pellicciari C, Caserini C, Bottiroli G, Belleri M, Viecesteinas A. Sinusoidal 50 Hz magnetic fields do not affect structural morphology and proliferation of human cells in vitro. *Histol Histopathol* 2001. 16(3):719-26.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>2n:</b>	juego completo de cromátidas
<b>a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>:</b>	experimentos por duplicado
<b>AM:</b>	Amplitud Modulada
<b>APC:</b>	Complejo Promotor de Anafase
<b>ATTC:</b>	American Tissue Type Culture Collection
<b>ATP:</b>	Adenosin Trifosfato
<b>AP:</b>	movimiento de cromosomas
<b>b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>:</b>	experimentos por duplicado
<b>Bax:</b>	proteína del proceso de apoptosis
<b>Bcl-2:</b>	proteína del proceso de apoptosis
<b>BCRA:</b>	gen ubicado en el cromosoma 17
<b>BIM-C:</b>	quinesina
<b>c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub>:</b>	experimentos por duplicado
<b>cm:</b>	centímetros
<b>cm<sup>2</sup>:</b>	centímetro cuadrados
<b>°C:</b>	grados Centígrados
<b>cel/ caja:</b>	cantidad de células por caja
<b>CenH3/ H4:</b>	tipo especial de histonas
<b>Cdc20:</b>	proteína del ciclo celular
<b>CDSI:</b>	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
<b>CLIS:</b>	Carcinoma Lobulillar <i>In Situ</i>
<b>CM:</b>	Campo Magnético

<b>CMs:</b>	Campos Magnéticos
<b>CEMs:</b>	Campos Electromagnéticos
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Bióxido de Carbono
<b>Ctf7p/ Eco1p:</b>	factor de establecimiento de la cohesina de complejo protéico
<b>d<sub>1</sub>, d<sub>2</sub>:</b>	experimentos por duplicado
<b>DMBA:</b>	Dimetil Benzantraceno
<b>DMEM:</b>	medio de cultivo celular
<b>DNA:</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ELF:</b>	radiación de muy baja energía (Electro Low Frequency)
<b>f:</b>	frecuencia de vibración
<b>FM:</b>	Frecuencia Modulada
<b>g:</b>	gramos
<b>GBM:</b>	Glioblastoma multiforme
<b>G<sub>1</sub>:</b>	fase del ciclo celular
<b>G<sub>2</sub>:</b>	fase del ciclo celular
<b>GSM:</b>	señal de telefonía móvil (Group Special Movil)
<b>GHz:</b>	Giga Hertzio
<b>GTP:</b>	Guanosin Trifosfato
<b>Hep3B:</b>	células de hepatoma humano
<b><i>Her 2 neu</i>:</b>	gen ubicado en el cromosoma 17
<b>HNa:</b>	Hidruro de Sodio
<b>Hz:</b>	Hertzio
<b>Irr1p/Scc3p:</b>	factor estructural de cohesión de complejo protéico

<b>IR:</b>	Infrarrojo
<b>K<sup>+</sup>:</b>	Potasio. Elemento de la tabla periódica
<b>KHz:</b>	Kilo Hertzio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b>	Fosfato Diácido de Potasio
<b>KCl:</b>	Cloruro de Potasio
<b>KMTs:</b>	microtúbulos cinetocóricos
<b>KinI:</b>	exotubulasa
<b>lb/ in<sub>2</sub>:</b>	libra/ pulgada cuadrada
<b>LF:</b>	radiación de baja energía (Low Frequency)
<b>mm:</b>	milímetros
<b>ml:</b>	mililitros
<b>mM:</b>	milimolar
<b>mG:</b>	mili Gauss, unidad de campos eléctricos
<b>mV:</b>	milivoltios
<b>M:</b>	molaridad
<b>M/ A:</b>	Metafase/ Anafase
<b>Mad2p:</b>	proteína que determina el punto de verificación metafase/ anafase
<b>Mcd1p/Scc1p:</b>	factor estructural de cohesión de complejo protéico
<b>M-Cdk:</b>	complejo de ciclina que regula el ciclo celular
<b>MCF-7:</b>	línea celular de cáncer de seno
<b>MDA-MB-231:</b>	línea celular de cáncer de seno
<b>MHz:</b>	Mega Hertzio
<b>M.O.:</b>	Microondas

<b>MT:</b>	Microtúbulo
<b>MTs:</b>	Microtúbulos
<b>MTT:</b>	ensayo de reducción de la sal de tetrazolio para determinar actividad mitocondrial
<b>mT:</b>	micro teslas
<b>MTCOs:</b>	Centros Organizadores de los Microtúbulos
<b>Na<sup>+</sup>:</b>	Sodio. Elemento de la tabla periódica
<b>NaCl:</b>	Cloruro de Sodio
<b>NaOH:</b>	Hidróxido de Sodio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:</b>	Fosfato de Hidrógeno Disódico
<b>NOS:</b>	No Especificado de Otra forma (Not Otherwise Specified)
<b>NuMA:</b>	proteína fibrosa
<b>pmoles:</b>	picomoles
<b>P:</b>	movimiento de los cromosomas hacia el Polo
<b>P53:</b>	gen ubicado en el cromosoma 17
<b>PCM:</b>	Material Pericentriolar
<b>PBS:</b>	solución buffer salina de fosfatos
<b>RAN:</b>	GTPasa
<b>RE:</b>	Radiación Electromagnética
<b>REs:</b>	Radiaciones Electromagnéticas
<b>RF:</b>	Radio Frecuencias
<b>Rho:</b>	ATPasa
<b>RI:</b>	Radiaciones Ionizantes

<b>RNI:</b>	Radiaciones No Ionizantes
<b>rpm:</b>	revoluciones por minuto
<b>seg:</b>	segundo
<b>S:</b>	fase de Síntesis del ciclo celular
<b>Scc2p:</b>	factor de complejo protéico
<b>Scc4p:</b>	factor de complejo protéico
<b>SFB:</b>	Suero Fetal Bovino
<b>Smc3p:</b>	factor estructural de cohesión de complejo protéico
<b>SRB:</b>	sulfohodamina
<b>t:</b>	tiempo
<b>T-47D:</b>	línea celular de cáncer de seno
<b>UV:</b>	Ultra Violeta
<b>V:</b>	voltios
<b>Vm:</b>	potencial de membrana
<b>V79:</b>	línea celular de cáncer de pulmón
<b>ZR-75-1:</b>	línea de cáncer de seno
<b>α:</b>	alfa
<b>α- tubulina:</b>	proteína alfa tubulina
<b>β:</b>	beta
<b>β- tubulina:</b>	proteína beta tubulina
<b>γ:</b>	gamma
<b>γ- TURC:</b>	complejo anular de tubulinas gamma
<b>λ:</b>	longitud de onda (lambda)

**%:** porcentaje

**μm:** micrómetros

**μl:** microlitro