

**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS**



**DINÁMICA NEURONAL BAJO EXPOSICIÓN A CAMPOS MAGNÉTICOS**  
**ALTERNOS DE BAJA FRECUENCIA E INTENSIDAD**

Memoria presentada por D. Rodolfo Naogit Pérez Bruzón para optar  
al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, 2005



## UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

LABORATORIO DE MAGNETOBIOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS.

FACULTAD DE MEDICINA. C/Domingo Miral, s/n.

Tels: 976 76 16 67 / 976 76 1684

Fax: 976 76 1754

50009 - Zaragoza

La Prof. Dra. D<sup>a</sup> María Jesús Azanza Ruíz, Catedrática de Biología, del Departamento de Anatomía e Histología Humanas y el Prof. Dr. D. Agustín del Moral Gámiz, Catedrático de Física de la Materia Condensada, del Departamento de Física de la Materia Condensada e Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Hacen constar

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Dinámica neuronal bajo exposición a campos magnéticos alternos de baja frecuencia e intensidad”**, presentada por D. Rodolfo Naogit Pérez Bruzón, ha sido realizada en el Laboratorio de Magnetobiología del Departamento de Anatomía e Histología Humanas bajo nuestra dirección, reúne los meritos de calidad y originalidad, y cumple con los requisitos reglamentarios exigidos para su tramitación.

Zaragoza, 2005

Fdo Prof. Dra. María Jesús Azanza Ruíz

Fdo Prof. Dr. Agustín del Moral Gámiz

*A todas aquellas personas  
que han contribuido  
en mi formación  
como profesional y ser humano.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Deseo, en primer lugar, agradecer de forma especial a mis directores de Tesis, Prof. Dra. María Jesús Azanza Ruíz y Prof. Dr. Agustín del Moral Gámiz por la confianza que han depositado en mí durante todos estos años, su apoyo incondicional y su importante papel en mi formación en el área de Magnetobiología.*

*Por otro lado, quiero manifestar mi profundo agradecimiento a todo el personal del Departamento por su continua dedicación. En particular a la Dra. Concha Junquera, por la Microscopia Electrónica, Dra. Julia Aisa, Dra. Manuel Lahoz, Prof. Dra. Carmen Pérez, así como a la Lic. Nieves Pes por su ayuda con las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.*

*Agradezco a la Dra. Ana Cris Calvo por la cooperación brindada en las técnicas electrofisiológicas y el manejo del Laboratorio y a la Lic. Montserrat Raso por su ayuda con las técnicas inmunohistoquímicas.*

*Un agradecimiento especial a los Drs. Primitivo Contamina y María Pilar Parra por su continuo entusiasmo y por el soporte informático brindado.*

*También quiero expresar mi agradecimiento a los Drs. María José Barral, María Teresa Peg, María Jesús Pinilla, así como a D<sup>a</sup>. Carlota Castillo, por el interés que han mostrado y por animarme en cada momento.*

*Deseo agradecer al Prof. Dr. René Sarrat Torreguitart, director del Departamento de Anatomía e Histología Humanas, por acogerme en dicho departamento para realizar esta Tesis y al Prof. Arturo Vera, decano de la Facultad de Medicina, por el importante apoyo brindado.*

*Gracias a todos aquellos que de una u otra forma han colaborado en el desarrollo exitoso de este trabajo, a D<sup>a</sup>. María Isabel Espiau, Dora Cobo, Gema Ojeda, Susana Pelechano y Lourdes Pueyo, y a D. Jesús Ruztanazo y Alfonso Condor.*

*Quiero agradecer, muy especialmente, a quienes me han apoyado siempre, compartiendo mis buenos y malos momentos, a mis padres y demás familiares.*

*Finalmente, agradezco a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) del Ministerio de Asuntos Exteriores, al Programa Nacional de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y a la "Fundación Humanismo y Ciencia" por el financiamiento concedido.*

# INDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.- ESTADO ACTUAL DEL TEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2.- CONCEPTOS BÁSICOS</b> .....	<b>6</b>
1.2.1.- MAGNETISMO EN LA MATERIA .....	<b>6</b>
1.2.2.- FISIOLÓGÍA DE LA NEURONA .....	<b>9</b>
<b>1.3.- ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
1.3.1.- ESTUDIOS EXPERIMENTALES BAJO EXPOSICIÓN A CEM .....	<b>16</b>
1.3.2.- INTERACCIONES Y MODELOS TEÓRICOS .....	<b>22</b>
1.3.2.1.- INTERACCIONES DE LOS CEM CON LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS .....	<b>22</b>
1.3.2.2.- MODELOS TEÓRICOS .....	<b>23</b>
<b>2.- OBJETO DEL TRABAJO</b> .....	<b>28</b>
<b>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.- DISECCIÓN DE LOS GANGLIOS CEREBROIDEOS Y MANTENIMIENTO DE LAS NEURONAS ...</b>	<b>30</b>
<b>3.2.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS NEURONAS</b> .....	<b>33</b>
3.2.1.- TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA CONVENCIONAL: MÉTODO DE HEMATOXILINA - EOSINA .....	<b>33</b>
3.2.2.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	<b>34</b>
3.2.3.- TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA. MÉTODO ENVISIÓN®, UTILIZADO .....	<b>35</b>
<b>PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CANALES IÓNICOS</b>	
<b>3.3.- OBTENCIÓN DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS Y APLICACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>DE CAMPO MAGNÉTICO</b>	
3.3.1.- OBTENCIÓN DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS .....	<b>39</b>
3.3.2.- APLICACIÓN DE CAMPO MAGNÉTICO .....	<b>42</b>
<b>4.- RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4.1.- MODELO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.- CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3.- MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE <i>HELIX ASPERSA</i></b> .....	<b>48</b>
4.3.1.- MÉTODO DE HEMATOXILINA - EOSINA .....	<b>48</b>
4.3.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: ULTRAESTRUCTURA .....	<b>49</b>
4.3.3.- CARACTERIZACIÓN DE CANALES IÓNICOS POR INMUNOCITOQUIMIA .....	<b>57</b>
<b>4.4.- ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA</b> .....	<b>65</b>
<b>NEURONAL CON EL CAMPO MAGNÉTICO APLICADO</b>	
4.4.1.- BLOQUE 1. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CMA DE .....	<b>66</b>
<b>INTENSIDAD CONSTANTE Y FRECUENCIA VARIABLE EN EL RANGO DEL EEG HUMANO</b>	
4.4.2.- BLOQUE 2. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN .....	<b>74</b>
<b>CMA DE INTENSIDAD VARIABLE Y FRECUENCIA CONSTANTE E IGUAL</b>	
<b>A LA DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA NEURONA</b>	

4.4.3.- BLOQUE 3. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CMA .....	81
DE INTENSIDAD CONSTANTE Y VARIACIÓN CRECIENTE DE LA FRECUENCIA EN EL RANGO DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA	
4.4.4.- BLOQUE 4. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN .....	88
DE UN CMA DE INTENSIDAD CONSTANTE Y FRECUENCIA VARIABLE ALREDEDOR DE LA FRECUENCIA ESPONTÁNEA DE LA NEURONA	
4.4.5.- BLOQUE 5. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO CONDICIONES .....	93
NO HABITUALES EN NUESTRA EXPERIMENTACIÓN	
4.4.5.1.- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO DE 217 Hz .....	93
4.4.5.2.- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO DEL ORDEN DE LOS $\mu\text{T}$ ...	96
4.4.5.3.- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO VARIACIONES DE TEMPERATURA .....	98
DE LA SOLUCIÓN RINGER EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE CAMPO MAGNÉTICO	
4.5.- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LOS POTENCIALES .....	103
4.5.1.- MORFOLOGÍA DE LOS POTENCIALES .....	103
5.- MODELOS TEÓRICOS .....	110
5.1.- MODELOS DEL EFECTO DE UN CAMPO MAGNÉTICO DE FRECUENCIA .....	116
EXTREMADAMENTE BAJA CON MEMBRANAS NEURONALES	
5.1.1.- ECUACIÓN DE HODGKIN-HUXLEY (HH) SUPLEMENTADA POR CAMPO .....	117
MAGNÉTICO (ECUACIÓN HHM) Y CÁLCULO DEL VOLTAJE TRANSMEMBRANA: DEPENDENCIA TEMPORAL Y ESPECTRO EN FRECUENCIA	
5.1.2.- OBTENCIÓN DEL ESPECTRO DE LA FRECUENCIA DE DISPARO .....	124
DE LA NEURONA FRENTE A LA DEL CAMPO MAGNÉTICO ALTERNO APLICADO	
5.1.3.- EXTENSIÓN DEL MODELO HHM A DIVERSAS POBLACIONES DE CANALES .....	127
DE POTASIO E INTRODUCCIÓN EXPLÍCITA DEL CAMPO APLICADO B	
5.1.4.- CÁLCULO DE LA EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL POTENCIAL DE DESPOLARIZACIÓN .....	132
6.- DISCUSIÓN Y COMPARACIÓN CON LOS MODELOS TEÓRICOS .....	135
6.1.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	135
6.2.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES .....	150
CON LOS MODELOS TEÓRICOS	
7.- CONCLUSIONES .....	163
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	170

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- ESTADO ACTUAL DE TEMA

En la sociedad moderna el hombre se encuentra expuesto continuamente a campos electromagnéticos (CEM) generados por fuentes diversas. Los efectos biológicos de los CEM encontrados en estudios realizados en muestras biológicas han llamado la atención de la comunidad científica conduciendo a un incremento de las investigaciones en esta dirección. Dentro del espectro electromagnético, la atención se ha centrado en el rango no ionizante especialmente el correspondiente a los campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (FEB) y radiofrecuencia (RF). Diversas teorías, modelos y simulaciones se han utilizado con el fin de definir los mecanismos de interacción de los CEM con los sistemas biológicos, sin embargo los resultados encontrados continúan siendo controvertidos.

En diciembre de 1997, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su reunión anual en Ginebra, tras examinar los resultados disponibles sobre los efectos biológicos de los CEM, definió los objetivos prioritarios de la investigación, proponiendo:

*“...estudios in vivo, con el fin de caracterizar la neurofisiología y la conducta; alteración del sueño; cambios en el metabolismo de los neurotransmisores; influencia en el aprendizaje y la memoria; posible influencia en procesos neurodegenerativos y enfermedades como el Alzheimer...”*

*“...estudios epidemiológicos, para determinar la exposición a campos magnéticos (CM) de frecuencias extremadamente bajas e incidencia de cáncer, particularmente leucemia en niños; posible relación entre exposición a CM de FEB y cáncer de mama; desordenes del sistema nervioso central, neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares...”*

*“...estudios en voluntarios humanos: modificación de la melatonina; modificación del ritmo cardíaco y de la actividad electrofisiológica del sistema nervioso central; estudios de subjetividad y efectos inespecíficos...”*

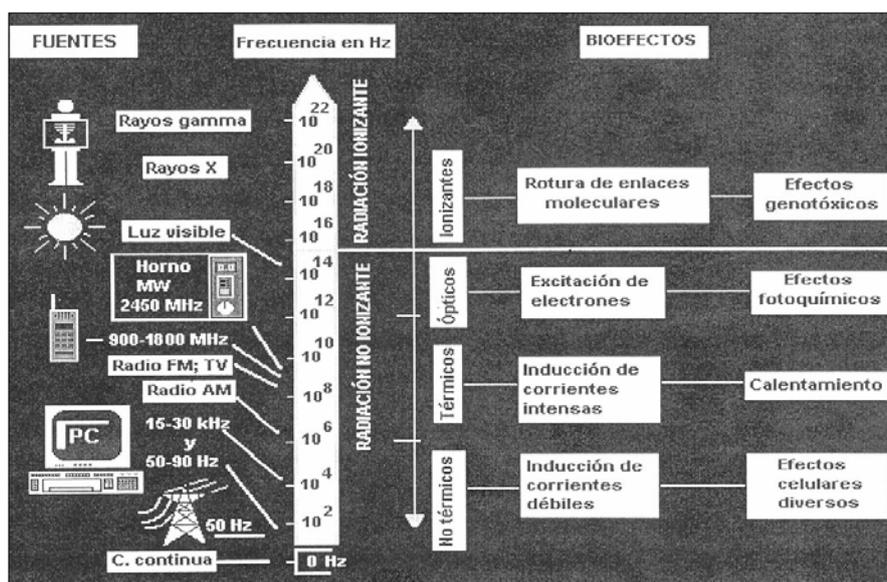
*“...estudios in vitro con el fin de profundizar en los mecanismos básicos de interacción, los umbrales y la relación dosis - respuesta para los CM de FEB. Estudiar así los efectos a los niveles celular, subcelular, y molecular. Estos experimentos deberán enfocarse en el estudio de cambios estructurales y funcionales en células vivas, que pudieran conducir a efectos carcinogénicos u otros con consecuencias adversas para la salud, resultado de la exposición a dichos campos. En los casos en que fuera posible, los estudios deberían considerar las exposiciones que incluyen: intermitencias, transitorios y duración en el tiempo, como variables importantes...”*

*“...estudios teóricos para desarrollar los posibles mecanismos biofísicos que expliquen los efectos in vitro e in vivo a campos relativamente altos (> 0.1 mT); dosimetría e instrumentación...”*

Se han llevado a cabo investigaciones científicas con el objetivo de definir los posibles efectos biológicos de los CEM, pero los resultados obtenidos continúan siendo insuficientes para llegar a conclusiones definitivas. En este sentido destaca el proyecto REFLEX (Adlkofer, 2003), en el que han colaborado doce instituciones científicas de siete países europeos, para poder comparar los resultados obtenidos y su replicación en los diferentes laboratorios. Se han demostrado efectos genotóxicos en células de fibroblastos humanos en cultivos, tanto bajo exposición a CEM de baja frecuencia e intensidad como bajo exposición a RF. Se ha observado un nivel significativo de ruptura de la cadena de ADN seguido de varios tipos de aberraciones cromosómicas. Los daños del ADN se observaron para los CEM de FEB y baja intensidad a densidades de 35  $\mu$ T y con RF para un valor SAR de 2W/Kg. Para valores SAR de 1.5 W/Kg fue posible la regulación de la expresión de genes tales como hsp70, p21, c-jun y c-myc, en células madres de ratón deficientes en p-53. Después de disminuir el valor SAR no se observaron efectos en la concentración de mRNA (Adlkofer, 2003).

Dentro del espectro electromagnético (Fig. 1.1), las ondas en el rango de FEB, son de carácter no ionizante, es decir, no poseen suficiente energía para ionizar las estructuras moleculares con las que interaccionan. Por esta razón durante mucho

tiempo se consideró que los CM de FEB, en su interacción con la materia viva, podrían ceder muy poca energía al sistema, descartándose la posibilidad de inducción de cualquier efecto biológico. El descubrimiento de las bacterias magnetotácticas, capaces de producir metabólicamente magnetita biógena para su orientación en el campo geomagnético (Blakemore, 1975), fue decisivo para el reconocimiento de los efectos no térmicos (atérmicos) de los campos magnéticos estáticos (CME) y campos magnéticos alternos de FEB.



**Figura 1.1.-** Espectro Electromagnético y sus efectos biológicos en función de la frecuencia (Úbeda y Trillo, 1999).

La propia naturaleza del problema y las formas en que es posible orientar la investigación, son en sí mismas fuentes de controversia. Se pueden estudiar los efectos biológicos inducidos por un campo eléctrico (CE) o por un CM separadamente, o bien, conjuntamente aplicando un CEM. Los parámetros a escoger son numerosos: frecuencia; intensidad de campo (o densidad de flujo magnético, en su caso); forma de onda (sinusoidal, cuadrada, etc.); tiempo de exposición, entre otros. El modelo biológico puede ser muy diverso: estudios *in vivo* o *in vitro*, en animales de experimentación o en voluntarios humanos. Todos estos factores hacen que las condiciones experimentales no sean homogéneas, y que resulte difícil conseguir una sistematización de la relación exposición/efectos observados, así como cualquier tentativa de réplica y contrastación de resultados entre laboratorios diferentes.

La controversia acerca de los posibles efectos biológicos inducidos por la exposición a los CEM de FEB constituye un tema de debate a nivel internacional, llegando a considerarse los resultados experimentales obtenidos con escepticismo. Una cuestión que con frecuencia se plantea es si los CM son perjudiciales o, por el contrario, resultan beneficiosos. Es importante aclarar, que el hecho de que se observen experimentalmente efectos biológicos bajo exposición a CME y CM de FEB, no implica necesariamente que se deriven efectos perjudiciales para la salud en humanos. No obstante es un indicio, por lo que se debe aplicar el "Principio de Precaución".

Objeto de preocupación científica y pública, es la posible inducción de procesos cancerígenos. Los posibles efectos genotóxicos son muy discutidos. Se ha descrito un aumento significativo en la síntesis de ADN en cultivos de fibroblastos humanos expuestos a la acción de CM de 15 Hz e intensidades muy bajas (Liboff, 1985). Un estudio llevado a acabo en Suiza, mostró que los trabajadores de una estación de ferrocarril, expuestos a un CM cercano a 17 Hz e intensidad entre 2 y 15  $\mu$ T, sufrían alteraciones cromosómicas (Nordenson et al., 2001). Estudios realizados en células HL60, sugirieron que una exposición prolongada a CM de 50 Hz puede alterar procesos moleculares relacionados con los genes que expresan el receptor de citoquina (Zhou et al., 2002). Otros estudios realizados no muestran estos hallazgos. La exposición a CM de 50 Hz e intensidad entre 2 y 20 mT, no parece aumentar la síntesis de ADN en fibroblastos humanos (Cridland et al., 1999). No se encontró aumento significativo de microtúbulos de eritroblastos de ratón, bajo CM de 50 Hz y 14  $\mu$ T (Zetterberg y Grawé, 2001). No se observó ningún efecto en la proliferación celular ni en la síntesis de ADN, aplicando CM de 50 y 60 Hz (Yoshizawa et al., 2002). En relación con esta problemática, la hipótesis que ha ganado mayor aceptación en los últimos años es la que sugiere que los CEM de FEB no son *iniciadores* de carcinogénesis sino que pueden actuar como *promotores* o *copromotores* del cáncer una vez iniciado, por otras vías, el proceso de carcinogénesis (Li et al., 1999; Robinson et al., 2002). La aplicación de CM de 50 Hz e intensidad entre 0.1 y 1 mT en distintos tipos de líneas celulares humanas, *in vitro*, ha corroborado esta hipótesis (Simkó et al., 1998).

Una de las dianas de la interacción de los CEM, es la membrana biológica. Se han esquematizado los principales efectos observados, como integrantes de una cadena de interferencias de los CEM en las vías de transducción de las señales biológicas. Las variaciones en la concentración citosólica del calcio se destaca como uno de los mecanismos más importantes mediadores de las posibles influencias de los CEM de FEB, y su amplificación y expresión en la compleja vía de transducción de las señales biológicas (Tenforde, 1991; Galvanovskis et al., 1999). Las modificaciones en las oscilaciones citosólicas del calcio, bajo exposición a un CM de FEB, constituye uno de los aspectos en los que más se ha avanzado en los últimos años. Los fenómenos oscilatorios juegan un importante papel, tanto para el funcionamiento como para el procesamiento de la información en los sistemas biológicos. Los fenómenos rítmicos son responsables de la creación, estabilización y mantenimiento de un cierto tipo de orden biológico. Las frecuencias responsables de tales fenómenos cubren un amplio espectro, desde décimas de Hz hasta los GHz. Lo que, actualmente se reconoce como oscilador de calcio, se produce en periodos de tiempo en el rango de 1 segundo a varios minutos. La importancia de este oscilador queda explicada por el hecho de que el calcio, como segundo mensajero, controla numerosos procesos subcelulares. Para un tipo celular determinado, el patrón de oscilación puede ser función de la sustancia aplicada y de su concentración, de lo que se infiere que las oscilaciones del calcio intracelular constituyen un sistema biológico codificado en frecuencia (Berridge y Galione, 1988).

Se ha demostrado que las ondas electromagnéticas producen modificaciones en la estructura de la membrana modificando la fluidez de la misma. Por citofluorometría, se realizaron estudios de la dinámica de los lípidos de membrana, observándose disminuciones en la fluidez de la membrana plasmática con CM de 50 Hz y 70  $\mu$ T (Volpe et al., 1998).

En 1995, se aceptó que *“...partiendo de nuestros conocimientos actuales sobre la naturaleza de las respuestas de las moléculas y células a las ondas electromagnéticas, las células las perciben como cualquier otro cambio sutil en el medio ambiente físico, y responden con una perturbación transitoria de ajuste, de su maquinaria metabólica...”* (Goodman et al., 1995). Recientes observaciones han demostrado que los efectos

inducidos en determinadas condiciones experimentales bien controladas son reversibles, lo que se ha interpretado como reflejo de un mecanismo de adaptación de células y tejidos a los CEM (Azanza et al., 2002a; Volpe, 2003).

## 1.2.- CONCEPTOS BÁSICOS

### 1.2.1.- MAGNETISMO EN LA MATERIA

El magnetismo en la materia procede del hecho de que sus cargas constitutivas están en movimiento (mecano-cuánticamente de existir un momento angular  $\vec{\ell}$  con valor esperado  $\langle \vec{\ell} \rangle$  no nulo. Los electrones en sus orbitales atómicos dan origen al momento magnético orbital. El electrón posee, además, un momento magnético intrínseco o de espín, ya que puede considerarse clásicamente como una carga electrónica girando alrededor de un eje interno. El núcleo de la mayoría de los átomos, tiene también un momento magnético nuclear que es del orden de una milésima parte del valor de los momentos magnético orbital y de espín. El momento magnético de un átomo,  $\vec{m}$  es, por lo tanto, resultado de los tres momentos anteriores, siendo los más importantes el orbital y el de espín. Por las características del momento magnético resultante, se pueden distinguir tres tipos de sustancias con propiedades magnéticas diferentes.

La mayoría de los átomos o moléculas tienen una estructura electrónica tal que el momento magnético resultante es nulo. A estas sustancias se les conoce como *diamagnéticas*. Cuando sobre un material diamagnético actúa un CM externo, sus átomos adquieren un momento magnético en la dirección del campo y en sentido opuesto, y como consecuencia una imanación opuesta al campo. El CM trata de alinear en su dirección a los momentos magnéticos del átomo o molécula, produciendo la imanación de la sustancia. La mayor parte de los átomos o moléculas que componen las sustancias orgánicas son diamagnéticas, dado que sus átomos poseen sus capas atómicas completas, y el único momento magnético que pueden adquirir es el diamagnético, o momento inducido opuesto al campo, consecuencia de la ley de inducción de Faraday. La imanación,  $\vec{M}$ , se define como el momento magnético por unidad de volumen, es decir, como el momento suma de los átomos, o moléculas

contenidas en la unidad de volumen,  $\vec{M} = N \vec{m}$ , donde  $N$  es el número de átomos o moléculas por  $m^3$ . La susceptibilidad magnética,  $\chi$  relaciona la imanación,  $\vec{M}$  con la intensidad del CM,  $\vec{H}$ , de modo que:  $\vec{M} = \chi \vec{H}$ ;  $\chi$  puede ser un tensor, como ocurre en las biomoléculas. Para las sustancias diamagnéticas,  $\chi$  es generalmente pequeña y negativa ( $\chi \approx -10^{-5}$  a  $-10^{-7}$ ), aunque importante en el caso de la materia viva, es decir biomoléculas, células y tejidos, donde es considerablemente mayor y además depende de la dirección de medida en la molécula, lo que se denomina *anisotropía diamagnética*, es decir  $\chi_{\parallel}$  cuando  $\vec{H}$  es paralelo al eje mayor de la biomolécula es notablemente diferente a  $\chi_{\perp}$ , cuando  $\vec{H}$  se aplica normalmente a dicho eje. Esta anisotropía diamagnética se mide por tanto mediante  $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$  y puede ser positiva (caso de los fosfolípidos) o negativa (caso usual de las proteínas de membrana).

Existen otro tipo de sustancias que se denominan *paramagnéticas*. A diferencia de las anteriores, sus átomos poseen un momento magnético propio o permanente y responden de manera diferente a la acción de un CM: se iman en la dirección y sentido del campo externo. Al efecto orientador del CM sobre los momentos atómicos y moleculares se oponen las fluctuaciones térmicas de éstos, por lo que  $\chi$  depende de la temperatura, decreciendo en la forma:  $\chi = C/T$ , donde  $C$  es la constante de Curie. A la relación anterior se le conoce como *ley de Curie*. En este caso, la susceptibilidad magnética es positiva y en general también pequeña, aunque mayor que la diamagnética. El paramagnetismo está asociado con la presencia de electrones desapareados en los átomos, dado que dos electrones en la misma capa atómica con igual momento orbital,  $\vec{m}_L$  tienen espines de signos opuestos, de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli, y también con proyecciones  $m_L^z$  sobre el eje del campo de signos opuestos, pero magnitudes diferentes. Por tanto el momento magnético total  $\vec{m}_L + \vec{m}_s$  es no nulo. Una consecuencia importante es que las moléculas con radicales libres son paramagnéticas, al poseer electrones desapareados y pueden interactuar con un CM aplicado.

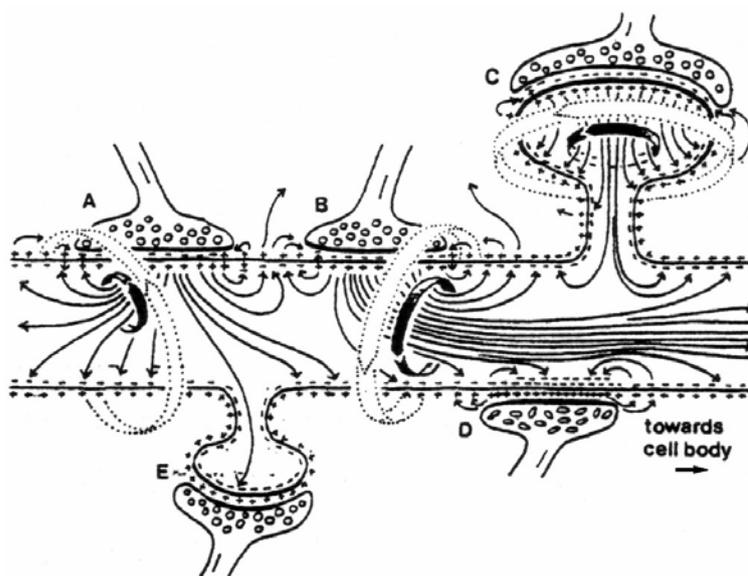
Un tercer tipo son las sustancias llamadas *ferromagnéticas* ( $F_M$ ) y *ferrimagnéticas* ( $F_{MI}$ ) que se caracterizan por presentar una imanación espontánea, es decir, en ausencia de CM aplicado. En estas sustancias, entre los espines de los átomos, existe una fuerte energía de interacción de origen mecanocuántico, denominada interacción de canje, la cual alinea (paralela en los  $F_M$  o antiparalelamente en los  $F_{MI}$ ) los espines de los electrones atómicos desapareados entre sí, produciendo la imanación espontánea. Estos dos tipos de sustancias magnéticas, presentes en la corteza terrestre pueden inducir importantes anomalías magnéticas. Materiales ferrimagnéticos como la magnetita biógena, se han encontrado en tejidos de distintos organismos: delfines (Zoeger et al., 1981); tortugas (Perry et al., 1985); moluscos (Azanza y Rassi, 1990); y tejidos humanos (Kirschvink et al., 1992). Estos materiales pueden jugar un papel importante en la generación de campos magnéticos de origen biológico, e interaccionar fuertemente con CM externos. Las sustancias ferromagnéticas poseen una imanación espontánea muy elevada, del orden de  $10^6$  veces mayor que las inducidas en un paramagnético o diamagnético. El ferromagnetismo lo presentan metales como el hierro, cobalto, níquel y, en la actualidad son conocidas miles de aleaciones y compuestos intermetálicos ferromagnéticos.

Debido a la naturaleza débilmente diamagnética de la materia orgánica, (baja susceptibilidad diamagnética,  $\chi$ , con permeabilidad magnética,  $\mu = \mu_0(1 + \chi)$ ), muy próxima a la del vacío,  $\mu_0$ , los sistemas biológicos *casí* no producen modificación alguna del CM al que son sometidos, resultando prácticamente permeables al mismo. En consecuencia, el CM no se perturba por el sistema, lo atraviesa sin modificar su intensidad, ya que no contiene ningún material fuertemente magnético (a excepción de los cristales de magnetita de tamaño nanométrico presentes en algunas estructuras biológicas). En contraposición, la intensidad del campo eléctrico,  $\vec{E}$ , disminuye fuertemente al penetrar dentro del organismo (su valor en el vacío dividido por la elevada constante dieléctrica del material vivo), por ejemplo  $\epsilon_r \approx 80$  para el agua y del orden de 10 para las biomoléculas. Por esta razón, se ha considerado que el CM tiene más probabilidades que el CE de inducir efectos biológicos sobre los tejidos vivos. Es bien conocido, por otra parte, que cuando más baja es la frecuencia de un CM mayor

es su capacidad de penetración, fenómeno conocido como efecto pelicular.

### 1.2.2.- FISIOLÓGÍA DE LA NEURONA

La neurona, como estructura biológica altamente especializada en fenómenos de naturaleza electromagnética, constituye un modelo experimental idóneo para el estudio de la interacción de los CEM con los organismos vivos.



**Figura 1.2.-** Ejemplo de un proceso electromagnético en la neurona. La actividad de las neuronas produce corrientes eléctricas (flechas finas de trazo continuo) que, a su vez, inducen CM perpendiculares (flechas anchas, claras y discontinuas y flechas anchas en negrita) (modificado de Romijn, 1997).

En la Fig. 1.2 se representa, esquemáticamente, una dendrita con tres sinapsis excitadoras A, B y C, una sinapsis inhibitoria D y una sinapsis inactiva E. En los contactos sinápticos A, B y C, se liberan neurotransmisores estimuladores. Estos neurotransmisores interactúan con sus receptores específicos, situados en la membrana postsináptica, y activan canales de Na<sup>+</sup>. Dichos iones se desplazan desde el medio extracelular hacia el interior de la dendrita, siguiendo sus gradientes electroquímicos, y, como son cargas eléctricas en movimiento, producen corrientes eléctricas (representadas por los haces de líneas delgadas, de trazado continuo y terminadas en punta de flecha). Estas corrientes eléctricas se distribuyen en el seno

del citoplasma (rico en iones), quedando confinadas dentro de la dendrita debido a las propiedades aislantes de su membrana plasmática (alto contenido en lípidos). Las corrientes eléctricas inducen un CM perpendicular (representado por flechas circulares, anchas y destacadas en negrita). Simultáneamente, la entrada de iones de  $\text{Na}^+$  produce una modificación del voltaje transmembrana. Se activan los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje adyacentes, produciéndose despolarizaciones que se propagan por la superficie de la membrana. El intercambio de los iones de  $\text{Na}^+$  origina, por lo tanto, una corriente eléctrica que, a su vez, genera un nuevo CM (representado por flechas circulares anchas, claras y discontinuas que abarcan todo el espesor de las dendritas). Mientras las corrientes eléctricas quedan confinadas dentro de la célula, el CM es capaz de atravesar libremente todas las estructuras biológicas ya que son totalmente permeables al campo magnético.

A ambos lados de cualquier membrana biológica, existe una desigual distribución de iones que generan diferencias de potencial eléctrico transmembrana. En el caso de las células nerviosas, supone energía potencial para la trasmisión de impulsos nerviosos. Aunque el gradiente de concentración de un ión sea elevado, puede existir una situación de equilibrio transmembrana siempre y cuando el gradiente químico se encuentre equilibrado por una diferencia de potencial transmembrana. La diferencia de potencial eléctrico transmembrana que supone la situación de equilibrio para cada tipo de ión, se denomina potencial de equilibrio del ión y viene expresada por la ecuación de Nernst. El potencial de equilibrio para un ión representa la situación en la que los gradientes químico y eléctrico que operan sobre el ión, a través de la membrana están en equilibrio. Siendo el gradiente electroquímico cero, no se produce flujo neto del mismo a través de la membrana, estableciéndose un equilibrio dinámico.

Los medios extracelular e intracelular están separados por una membrana plasmática, aislante (dieléctrico), de espesor  $\approx 50 \text{ \AA}$ , que constituye un condensador cargado. Como en un condensador físico, el exceso de carga se acumula en la superficie, manteniendo el interior en equilibrio eléctrico. De ahí que los fenómenos bioeléctricos sean procesos de superficie.

El potencial bioeléctrico de membrana se genera por el flujo pasivo de iones siguiendo sus gradientes electroquímicos. Los iones de potasio y sodio juegan un

papel fundamental en la génesis de la mayoría de los potenciales de membrana. Se puede considerar que son función de la relación entre las permeabilidades relativas de la membrana a los iones de potasio y sodio,  $P_K : P_{Na}$ . En condiciones de reposo, esta relación se encuentra en la proporción aproximada de 25 : 1, es decir la permeabilidad de la membrana frente a los iones de  $K^+$  es 25 veces mayor que la permeabilidad frente a los iones de  $Na^+$ . Los iones de potasio tienen, por lo tanto, una contribución importante para establecer el valor del potencial de reposo de la membrana ( $E_m$ ), que está próximo al potencial de equilibrio de los iones de  $K^+$  ( $E_k$ ).

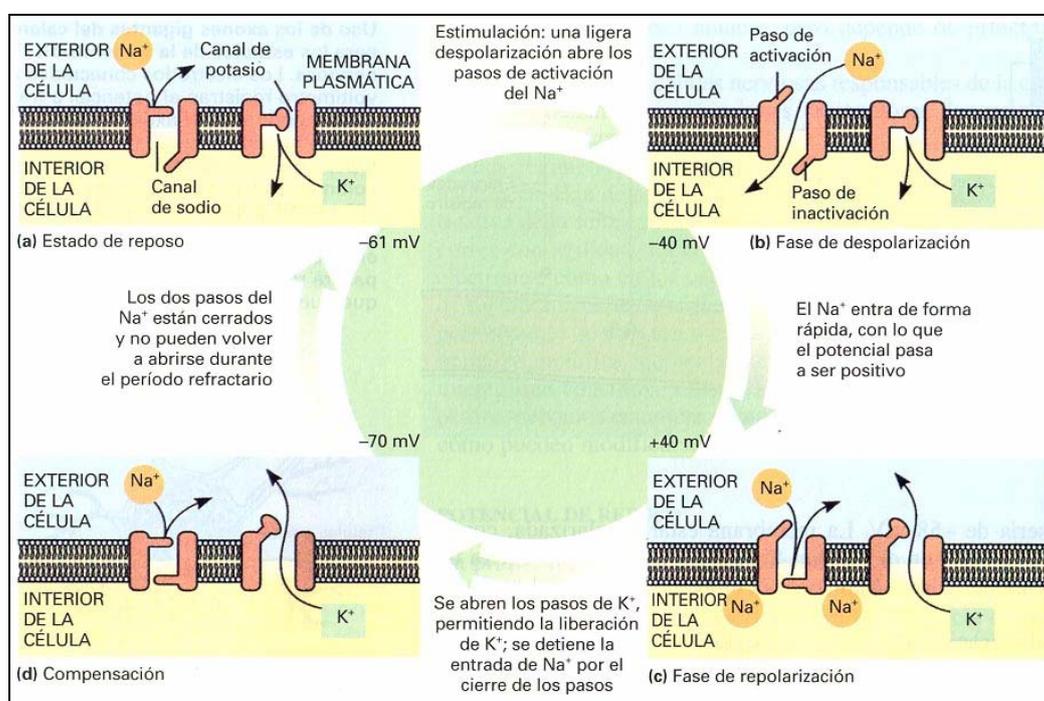
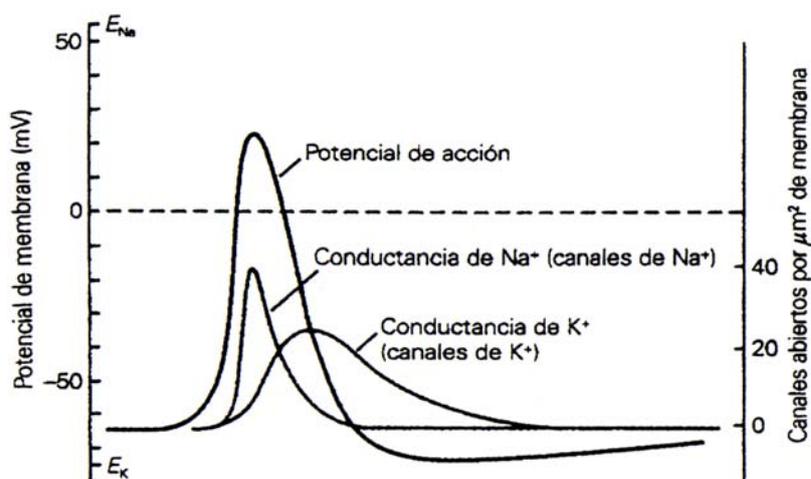


Figura 1.3.- Funcionamiento de los canales iónicos regulados por voltaje durante el potencial de acción (Mathews et al., 2002).

En la Fig. 1.3 se muestran las diferentes etapas del potencial de acción. Como consecuencia de la activación de la membrana, por aplicación de un estímulo, se modifica el estado de los canales iónicos alterándose, en consecuencia, la permeabilidad de la membrana frente a los iones. La dinámica de los canales iónicos: estado de reposo - apertura - inactivación, es altamente específica. En términos generales, y para un potencial bioeléctrico típico, se activan en primer lugar los canales de  $Na^+$ . Los iones de sodio se desplazan por simple difusión desde el medio extracelular al intracelular a favor del gradiente electroquímico. La cantidad de iones

de  $\text{Na}^+$  que entran en el medio intracelular está determinada por el valor de  $E_{\text{Na}}$ . A medida que aumenta la concentración citosólica de  $\text{Na}^+$ , el medio intracelular se hace positivo en relación con el medio extracelular, y la membrana se despolariza progresivamente. Cuando la despolarización alcanza el valor de  $E_{\text{Na}}$  ( $E_{\text{Na}} \approx +50 \text{ mV}$ ) se establece un equilibrio dinámico entre los gradientes químico y eléctrico transmembrana que operan sobre los iones de  $\text{Na}^+$ . En el intervalo de tiempo en el que se alcanza  $E_{\text{Na}}$ , los canales de  $\text{Na}^+$  pasan al estado inactivo. Con un retardo de unos pocos milisegundos, después de la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$ , se activan los denominados canales de  $\text{K}^+$  de *rectificación retardada*. Esta apertura coincide con la fase de despolarización, lo que determina el incremento de la fuerza neta conductora que impulsa a los iones de  $\text{K}^+$  a salir al medio extracelular, por simple difusión, a favor del gradiente electroquímico (Fig. 1.4). La pérdida de cargas positivas por la salida de  $\text{K}^+$  simultánea a la entrada de  $\text{Na}^+$  hace que en la despolarización no se alcance el valor exacto de  $E_{\text{Na}}$ . La amplitud de los potenciales de acción queda por debajo de la predicción teórica. La cinética de los canales de  $\text{K}^+$  es tal que la apertura máxima de canales coincide con la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$ , por lo que los iones de  $\text{K}^+$  salen al medio extracelular hasta alcanzar el valor neto de  $E_{\text{K}}$ . La salida de los iones de  $\text{K}^+$  produce sucesivamente la repolarización de la membrana, y la subsiguiente hiperpolarización hasta  $V_{\text{K}}$ . En el tiempo en que se completa la hiperpolarización, el medio intracelular presenta un exceso de iones de  $\text{Na}^+$  y un defecto de iones de  $\text{K}^+$ . El restablecimiento de las concentraciones iónicas iniciales es un proceso que consume energía y depende de la bomba de intercambio  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$ . Los procesos de despolarización, repolarización e hiperpolarización, son procesos de difusión pasiva de iones a través de la membrana. La hiperpolarización terminal es un proceso activo, la energía de hidrólisis del ATP se utiliza para bombear  $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$  en contra del gradiente. La bomba sodio - potasio es electrogénica, el restablecimiento del valor  $V_{\text{m}}$  ( $\approx -60 \text{ mV}$ ) requiere la salida de  $\text{Cl}^-$  hacia el medio extracelular a favor del gradiente electroquímico ( $V_{\text{Cl}} \approx -20 \text{ mV}$ ) (Kerkut y York, 1971).



**Figura 1.4.-** La apertura secuencial de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sensibles al voltaje generan el potencial de acción. Se muestra el cambio de conductancia durante un potencial de acción, correspondiente a la apertura de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  de rectificación retardada (adaptado de Kandel et al., 2001). El potencial de acción, en vertebrados e invertebrados puede depender no sólo de los iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sino también del  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho en *Helix aspersa* pueden participar tanto el  $\text{Na}^+$  como el  $\text{Ca}^{2+}$  en la despolarización de algunas neuronas (Walker et al., 1976).

Para cada neurona, la amplitud del impulso nervioso está determinada por los valores de  $E_{\text{Na}}$  y  $E_{\text{K}}$  (Fig. 1.4). En ciertas neuronas, los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  son fundamentales en la generación de la despolarización. En las neuronas en las que  $V_{\text{Ca}} < V_{\text{Na}}$  los potenciales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden reconocerse por ser de menor amplitud que los potenciales típicos dependientes del  $\text{Na}^+$ . No obstante, hay neuronas en las que  $V_{\text{Ca}} > V_{\text{Na}}$  observándose potenciales de mayor amplitud que los debidos al  $\text{Na}^+$ . Las modificaciones en la amplitud de los potenciales bioeléctricos son uno de los parámetros que se ven afectados en las neuronas sometidas a la exposición a campo magnético alterno.

La función fundamental de los canales iónicos en las neuronas es generar señales eléctricas transitorias. Se conocen tres mecanismos fundamentales de regulación del tiempo en que un canal permanece abierto y activo. Algunos canales son regulados por ligandos químicos. El ligando se puede unir directamente a la proteína canal, sea en un sitio receptor extracelular, en el caso de los neurotransmisores (canales iónicos ionotropos), o en un sitio receptor intracelular, caso de ciertas moléculas reguladoras presentes en el citoplasma, como el  $\text{Ca}^{2+}$  y los nucleótidos. Un segundo mecanismo se

basa en la regulación de los canales iónicos por fosforilación. El ligando interacciona con un receptor de membrana, activándose la proteína G y la cascada de señalización intracelular (canales iónicos metabotropos). En ese caso, las respuestas neuronales pueden ser más complejas y se producen con cierto retraso temporal. En un tercer mecanismo, los canales iónicos están regulados por las variaciones en el potencial eléctrico transmembrana (canales iónicos operados por voltaje). Bajo la influencia de estos sistemas de regulación, los canales entran en uno de los tres estados funcionales posibles: cerrados y activables (estado de reposo), abiertos (estado activo), o cerrado e inactivos (estado refractario). Los canales regulados por ligando pueden entrar en período refractario cuando la exposición al ligando es prolongada, o bien, cuando la concentración de ligando excede los valores fisiológicos. Este proceso se conoce como desensibilización del receptor. En algunos canales iónicos la desensibilización parece ser una propiedad intrínseca, consecuencia de la interacción ligando - receptor, mientras que en otros se debe a la fosforilación de la proteína canal por una proteinquinasa.

Factores exógenos, como fármacos y toxinas, pueden interactuar con los sitios de regulación de los canales iónicos. La mayoría de estas sustancias tienden a cerrar los canales, mientras que otros los abren. Algunos compuestos se unen en el sitio específico de interacción del ligando fisiológico, impidiendo la interacción del mismo y bloqueando su acción (antagonistas) o mimetizando su efecto habitual (agonistas). Para que un estímulo provoque el cambio conformacional en la proteína canal, necesario para que se modifique su estado de cerrado a abierto, se debe suministrar energía. En el caso de los canales regulados por voltaje, la energía procede del desplazamiento de una región cargada, llamada *sensor de voltaje*, bajo acción del campo eléctrico transmembrana. En los canales regulados por ligando, la regulación es función de la variación de energía libre que se produce como consecuencia de la unión ligando - receptor. Las señales que regulan el canal también controlan la velocidad de transición entre los estados abierto y cerrado del mismo (Kandel et al., 2001).

Neuronas con distintas combinaciones de canales iónicos responden de forma diferente a una corriente excitadora constante. Algunas responden con un solo potencial de acción, otras con un tren de potenciales de frecuencia constante y otras con trenes de potenciales de frecuencia creciente (en ráfagas) o frecuencia decreciente (con disminución de la frecuencia). Algunas neuronas identificadas como neuronas marcapasos, pueden producir espontáneamente, breves ráfagas de potenciales de acción. Cada ráfaga de potenciales está desencadenada por una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia dentro de la membrana, a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, que se activan para valores relativamente bajos de despolarización ( $< 10$  mV). Este influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  genera despolarización suficiente para alcanzar el umbral de estimulación, y genera un tren de potenciales de acción que dependen del  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta despolarización inicial puede activar los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. Con frecuencia, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se disponen próximos a canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , formando clústeres. El  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la despolarización activa la salida de  $\text{K}^+$  y de ahí la hiperpolarización de la membrana. Es decir, que asociados a la entrada de iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , se pueden observar respuestas de estimulación potenciadas por la entrada de  $\text{Na}^+$ , o bien, respuestas de estimulación seguidas de hiperpolarización, debido a la salida de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  y eventual inhibición de la actividad neuronal. Con frecuencia la despolarización es de larga duración. La ultraestructura molecular de la membrana plasmática neuronal, definida por los tipos de proteínas canal, su localización y densidad relativa, determinan la morfología de los potenciales bioeléctricos que una neurona emite en respuesta a un estímulo. Las propiedades fisiológicas intrínsecas de la membrana plasmática de una neurona, juegan un papel fundamental a la hora de determinar la forma en que la neurona es capaz de transformar la información que recibe (aférente) en una corriente eferente, cómo se modula este proceso de transformación y qué patrón de disparo genera la neurona en su actividad bioeléctrica.

## 1.3.- ANTECEDENTES

### 1.3.1.- ESTUDIOS EXPERIMENTALES BAJO EXPOSICIÓN A CEM

En el estudio de la bibliografía se han seleccionado los trabajos experimentales en los que han sido utilizados CEM con valores de frecuencia e intensidad comparables a los usados en nuestra investigación.

La aplicación de corrientes eléctricas sinusoidales al axón gigante del calamar produce trenes de potenciales repetitivos en el rango de frecuencias del CM entre 20 y 80 Hz (Hirsch, 1965).

La exposición prolongada a un CM de 50 Hz y 20 mT durante 24 días, induce cambios morfológicos en el sistema nervioso, en el sistema linfático y en distintos órganos (Toroitsev et al., 1974).

Estudios realizados en cerebro de pollo mantenido *in vitro*, utilizando RF de 147 MHz modulada por un CEM de FEB en el rango de 6 a 75 Hz, mostraron un aumento en la liberación de calcio. Estos resultados demostraron que el efecto dependía del CEM de FEB; la RF portadora no producía ningún efecto biológico en el flujo de calcio transmembrana (Bawin et al., 1975; Bawin y Adey, 1976). Estos experimentos permitieron introducir el concepto de “ventana de frecuencia”, es decir la existencia de valores de frecuencia para los cuales la respuesta biológica es máxima.

Se observaron cambios en el metabolismo del cerebro de rata, cuando los animales fueron expuestos durante 15 días a un CM de 50 Hz e intensidad de 9.4 y 40 mT (Koludov y Chernysheva, 1980).

Trabajos realizados mostraron que CEM de 16 y 45 Hz pueden inducir, en embriones de pollo, un aumento del flujo de calcio en células nerviosas (Blackman et al., 1985 a, b).

La aplicación de bloqueantes específicos de canales iónicos (verapamil,

tetraetilamonio, d-tubocuranina), puso de manifiesto que los efectos inducidos por el CM en neuronas de *Helix aspersa* están mediados por la actividad conjunta de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Azanza, 1990).

En experimentos realizados en neuronas aisladas de *Helix aspersa*, con registro en tiempo real, bajo exposición a CME en el rango de 1 a 70 mT, se puso de manifiesto que un 70% de las neuronas muestran respuestas en frecuencia (20% son estimuladas y 50% son inhibidas), mientras que un 30% manifiestan respuestas en amplitud. Se encontró que la amplitud de los potenciales disminuye bajo CME de 70 mT, cuando el tiempo de exposición es prolongado (Azanza, 1993).

Se puso de manifiesto que bajo exposición a CEM de 1.5 y 10 Hz e intensidades entre 20 y 40  $\mu\text{T}$  la actividad intrínseca del sistema nervioso central de humanos se altera y el efecto observado fue dependiente de la frecuencia del campo aplicado (Bell et al., 1994).

Estudios realizados en células de eritroleucemia mostraron que si el ciclo de crecimiento celular se desarrolla bajo el efecto de un campo magnético producido por un solenoide (70  $\mu\text{T}$ , 50 Hz) más el campo geomagnético (45  $\mu\text{T}$ ), la dinámica de los lípidos de membrana decrece alrededor de un 10% durante 4 días de exposición. Después de 184 ó 395 días de exposición a campo magnético se observó una pequeña variación adicional, lo que sugirió la existencia de un fenómeno de adaptación. Cuando células diferenciables y no diferenciables fueron situadas en una habitación apantallada magnéticamente (CD 20 nT y CA 2.5 pT) no se observaron modificaciones en la dinámica de los lípidos de la membrana (Volpe et al., 1998).

En neuronas aisladas de *Helix aspersa*, bajo exposición a CM de FEB en el rango de 1 a 15 mT, se observó en un 27% de las neuronas estudiadas, un ritmo de descarga similar a la actividad de sincronización típica de mamíferos (Azanza y del Moral, 1998; Azanza et al., 2002b). La actividad inducida por exposición a CME y CMA reproduce las respuestas descritas en neuronas de mamíferos, en las condiciones en las que se lleva a cabo la estimulación magnética transcraneal (Azanza y Calvo, 2000).

Células de Osteoblastos (MC 3T3-E1) fueron expuestas a un CEM de 60 Hz y 0.7 mT durante 24 horas. Utilizando imágenes de contraste de fase y análisis computarizado de imágenes se comprobó que cuando no se tomó en consideración la orientación de la célula respecto al CEM las alteraciones morfológicas no fueron significativas y cuando la célula fue orientada paralela al campo eléctrico inducido (0.5 mV/m), ortogonal al CEM aplicado, se encontró un decremento significativo en la longitud de la célula (Lee y McLeod, 2000).

Células de astrocitoma humano U-373 MG fueron expuestas a un CEM de 50 Hz y 3 mT durante 24 horas. Los resultados mostraron un incremento de los niveles de concentración basal de calcio intracelular (de  $124 \pm 51$  nM a  $200 \pm 79$  nM). Pretratamiento de las células con  $1.2 \mu\text{M}$  de sustancia P (neurotransmisor que estimula el incremento de calcio citoplasmático y la secreción de IL-6) aumentó la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a  $555 \pm 278$  nM, mientras la exposición al CEM causó una caída significativa en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a  $327 \pm 146$  nM. Con la incorporación de la sustancia P la IL-6 fue aumentada. Inmediatamente después de la exposición a CEM y 24 horas después los niveles de IL-6 fueron aún más elevados que en los controles (aproximadamente 40%). Estos datos sugieren que el CEM puede influir en los procesos de transporte y homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  por cambios en las propiedades de la membrana. El incremento de los niveles de IL-6 después de 24 h de exposición al CEM puede confirmar la compleja conexión entre los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , la sustancia P y la vía de citoquinas (Aldinuci et al., 2000).

Se han estudiado los efectos inducidos en neuronas de mamíferos, mantenidas *in vitro*, al aplicar CM pulsantes de 10 a 25 Hz. Parece ser que estos campos favorecen el crecimiento axonal en la dirección de la corriente aplicada (Macias et al., 2000).

Experimentos muestran que la exposición a CEM de 50 Hz e intensidad de 3 mT puede alterar la dinámica del calcio intracelular en astrocitoma humano U-373 MG. Después de la aplicación del CEM los niveles de concentración basal de calcio intracelular se incrementaron de  $143 \pm 46$  nM a  $278 \pm 125$  nM. De estos estudios se llegó a la conclusión de que el CEM actúa en los almacenes de calcio intracelular (Pessina et al., 2001).

Células de PC6 (línea celular neuronal que es capaz de proliferar y diferenciarse espontáneamente o en presencia de varios agentes como el factor de crecimiento y los neurotransmisores) fueron expuestas a pulsos de CEM de frecuencia 2 Hz e intensidad 0.3 mT, 2 horas al día durante 2 días. Las células fueron tratadas con factor de crecimiento nervioso (FCN) con el fin de definir cualquier efecto interactivo. Se encontró que la proliferación no fue afectada ni por el CEM ni por el FCN solos o en combinación. La diferenciación expresada en crecimiento neurítico fue fuertemente regulado por el FCN, pero esta respuesta al FCN fue significativamente reducida en las células tratadas con CEM (Shah et al., 2001).

Estudios realizados sobre la dinámica de apertura de los canales de calcio, mediante técnica de patch-clamp, indican que un CMA de 0.02  $\mu$ T y frecuencia variable entre 14 y 50 Hz, no produce efectos detectables (Obo et al., 2002).

Fibroblastos humanos fueron expuestos de forma continua e intermitente a un CEM de frecuencia 50 Hz, e intensidad 1mT durante 24 horas. La exposición intermitente al CEM, a diferencia de la continua, condujo a un incremento significativo en los niveles de ruptura de la doble cadena de ADN, comparados con los grupos no tratados. Los mayores niveles para 5 minutos de exposición y 10 minutos sin campo (Ivancsits et al., 2002).

Experimentos con neuronas de ave expuestas a un pulso de RF similar al procedente de un teléfono móvil (portadora de 900 MHz, modulada por 217 Hz) mostró que el 76% de las neuronas respondió con un incremento de 3.5 veces en su razón de disparo. En las restantes neuronas hubo disminución de la frecuencia de disparo cuando se comparó con la espontánea (Beason y Semm, 2002).

En vesículas de membrana plasmática altamente purificadas de la planta espinaca (*Espínacia oleracea L*) expuestas a un CME de intensidad variable en el rango de 27 a 37  $\mu$ T y otro alterno con frecuencia variable entre 7 y 72 Hz y amplitud entre 13 y 114  $\mu$ T, se demostró que la combinación adecuada de un campo magnético estático y otro variable en el tiempo interactúa directamente con la proteína canal de calcio en la membrana celular (Bauréus et al., 2003).

Experimentos desarrollados en humanos epilépticos mostraron un incremento en la razón de disparo interictal cuando son expuestos a CME de 2 mT y alterno de frecuencia extremadamente baja en el rango de 0.01 a 0.02 Hz. Los resultados muestran que el incremento en la actividad puede ser más pronunciado para tiempos prolongados de exposición (Fuller et al., 2003).

Estudios realizados en células cromafín, usando el método de barrido diferencial RT, mostraron que bajo exposición a un CEM de 60 Hz y 0.7 mT, los patrones de expresión genética de los grupos tratados (factor de crecimiento nervioso y CEM) muestran diferencias, al menos, en 53 transcripciones cuando son comparados con las que no recibieron tratamiento (Olivares et al., 2004).

La exposición de neuronas del gránulo cerebeloso de ratas, a un CEM de 50 Hz durante 5 días, protege a las mismas de la apoptosis natural y promueve la supervivencia para una intensidad de campo de 300 mT (Oda y Koike, 2004).

Haciendo uso de la microscopia electrónica de barrido se observaron modificaciones en la morfología de células de queratinocitos humanos orales expuestas a un CEM de 2 mT y 50 Hz. Estas modificaciones se asociaron con cambios en la distribución de la actina. Las células expuestas mostraron una capacidad de división menor y su crecimiento celular disminuyó (Manni et al., 2004).

Experimentos realizados en cortes de hipocampo de ratón, expuestos a CEM de 15 mT y 0.16 Hz durante 30 minutos, mostraron un aumento de al menos tres veces en el AMP cíclico. Pulsos de CM con intensidad variable (9 - 15 mT) y duración de los ciclos entre 5 y 20 minutos duplicaron la concentración de AMP cíclico (Hogan y Wieraszko, 2004).

Resultados experimentales muestran que CEM de intensidad 2 y 5 mT, y frecuencia 50 Hz afectan el balance electrolítico de la placenta humana *in vitro* (Łopucki et al., 2004).

Estudios muestran que un CEM de 75 Hz e intensidad 125  $\mu$ T produce una disminución de aproximadamente un 54% en la actividad de la adenilato quinasa del segmento exterior de los bastones de la retina de bovino. Esta disminución de la actividad enzimática fue independiente del tiempo de exposición y resultó ser reversible (Ravera et al., 2004).

Experimentos realizados en neuronas de *Helix pomatia* muestran que cuando la solución fisiológica es tratada con un CM de 4 Hz y 2.5 mT durante 30 minutos y es mantenida a una temperatura de 23 °C la corriente de acetilcolina inducida disminuye, mientras que en un medio frío (12 °C) el efecto observado desaparece (Ayrapetyan et al., 2004).

Estudios realizados en humanos muestran que un CM de 37 Hz e intensidad pico de 80  $\mu$ T, con forma de onda cuadrada, altera la sensibilidad al dolor y sugieren que estos efectos pueden ser asociados con anomalías en la regulación cardiovascular (Ghione et al., 2004).

La exposición de cerebro de ratón a un CM de 1.2 mT y 60 Hz durante 3 horas muestra un incremento significativo en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). Esto sugiere que un campo con estas características podría deteriorar la defensa antioxidante del sistema más por la presencia de especies reactivas del oxígeno que por los radicales superóxido (Lee et al., 2004).

Experimentos llevados a cabo utilizando CM de diferentes frecuencias (7, 13 y 18 Hz) y amplitudes (50, 50 y 70  $\mu$ T) y a temperaturas diferentes (16, 18, y 24 °C) mostraron que los proteoliposomas expuestos a 18 Hz y 70  $\mu$ T durante 60 minutos y mantenidos a  $16 \pm 0.4$  °C tuvieron un incremento significativo en la permeabilidad de los hemicanales de  $\Delta A/\text{min} = 0.0007 \pm 0.0002$  a  $\Delta A/\text{min} = 0.0010 \pm 0.0001$ . Este incremento no fue observado para los proteoliposomas expuestos a CM y mantenidos a altas temperaturas (Ramundo-Orlando et al., 2005).

Estudios llevados a cabo sobre el comportamiento de la endocitosis de fase fluida, en tres líneas celulares diferentes, bajo la acción de una frecuencia portadora de 900 MHz modulada por 217 Hz y duración de pulso de 580  $\mu$ s, mostraron un incremento de 1.5 veces en la endocitosis, bajo un tiempo de exposición superior a 10 minutos. La respuesta ocurrió para valores umbrales comprendidos entre 1.3 y 2.6 W/Kg (Mahrouf et al., 2005).

Experimentos con células de PC12, bajo la acción de un CEM de 50 Hz y 1.36 mT, mostraron un efecto significativo del campo en el crecimiento neurítico, dependiente de la presencia de factor de crecimiento nervioso (Zhang et al., 2005).

El empleo de una cámara de infrarrojo reveló un incremento de temperatura de 2 °C, en el pabellón de la oreja, por el uso continuo durante 30 minutos de un teléfono GSM 900 (frecuencia portadora 902.4 MHz y potencia de 0.21 W) (Straume et al., 2005).

### **1.3.2.- INTERACCIONES Y MODELOS TEÓRICOS**

#### **1.3.2.1.- INTERACCIONES DE LOS CEM CON LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Los mecanismos físicos que pueden explicar las interacciones de los CEM con los sistemas biológicos permanecen hoy en día como una cuestión abierta. Los organismos vivos no perturban los CM, sean estáticos o alternos en el rango de las frecuencias extremadamente bajas, en contraste con los campos eléctricos puros. Esto es debido, por una parte, a que las células y tejidos vivos son débilmente diamagnéticos, excepto en el caso de unos pocos tejidos altamente especializados que contienen magnetita biógena o algunas macromoléculas con iones metálicos 3d de transición, con momento magnético. Por otra parte, es importante tener en cuenta que el CM debido a las corrientes *eddy* inducidas es mínimo, debido a la baja conductividad eléctrica de la materia viva en el rango de las FEB.

Las membranas de los organismos, por sus propiedades dieléctricas, poseen una importancia crucial como sitio de interacción de los CEM. El hecho de que las

membranas plasmáticas se comporten como sistemas termodinámicos de no equilibrio y no lineales, sugiere que los CEM pueden producir perturbaciones significativas de las mismas, originando cambios a nivel bioquímico y fisiológico a través de la vía de transducción de señales biológicas, como se ha demostrado experimentalmente. En las membranas plasmáticas se localizan complejos moleculares de transducción, que sirven de vínculo entre el estímulo externo recibido, sea un estímulo físico como los CEM o un estímulo químico como las hormonas o los neurotransmisores, induciéndose respuestas fisiológicas a través de la compleja maquinaria metabólica. De la misma forma que el sistema molecular de transducción de señales conduce a una amplificación del efecto inducido frente al estímulo aplicado, las membranas plasmáticas de las células actúan como amplificadores potentes de los procesos de interacción con los CEM.

#### **1.3.2.2.- MODELOS TEÓRICOS**

Una de las cuestiones fundamentales aún pendientes de resolver completamente es la explicación detallada de cómo un CM de baja intensidad, en el rango de las FEB, puede inducir efectos biológicos (Azanza y del Moral, 1994). En cualquier situación, se ha considerado que en relación con el estímulo asociado con el CEM débil aplicado y los sitios de interacción en la membrana, se debe producir una modificación altamente *cooperativa* en el enlace del calcio a las glicoproteínas de la superficie externa de la membrana, y que este proceso operaría como una etapa “amplificadora” (proceso no lineal) que se transformaría en un cambio en el eflujo de calcio transmembrana (Adey, 1981). La cooperatividad, en este contexto, se entiende como el proceso por el que siendo las señales de disparo de un proceso débiles, las respuestas son amplificadas en varios órdenes de magnitud.

El cooperativismo en los sistemas biológicos consiste en un mecanismo de interacciones de largo alcance y que da origen a la liberación de los iones solvatados enlazados a la superficie de la membrana entre las moléculas de membrana (fosfolípidos o proteínas), probablemente una interacción cuadrupolar eléctrica. La no-linealidad es responsable de las respuestas en “ventana” *de frecuencia*, es decir, la existencia de un intervalo de frecuencias donde la acción del CM de FEB se manifiesta. Los procesos de termodinámica de no-equilibrio en los efectos de cooperatividad,

pueden conducir a respuestas en “ventana” de intensidad, frecuencia y tiempo de exposición en la interacción de los CEM de FEB. El elevado gradiente de CE ( $\approx 10^5$  V/m) a través de la membrana, constituye una barrera de tal magnitud, que rechaza cualquier proceso iónico de equilibrio necesario para la estimulación celular, producida por voltajes débiles dependientes del CEM de FEB, aproximadamente  $10^6$  veces más débiles que el potencial transmembrana. El modelo de Hodgkin-Huxley (Hodgkin y Huxley, 1952) considera necesarios para producir la despolarización de la membrana, voltajes millones de veces más intensos que los producidos por CEM en condiciones experimentales (Azanza y del Moral, 1994). Por lo tanto, se necesita un proceso de “amplificación” de los campos extremadamente débiles para producir los efectos observados.

La cooperatividad se puede definir como cualquier oscilación dinámica o coherente, por la que un conjunto de macromoléculas actúan conjuntamente, produciendo una transición de un estado metaestable del conjunto, a otro estado. En la interacción de los CEM débiles con las células, el aspecto más importante es la amplificación de la energía. Las membranas celulares son los sitios claves para la transducción de los estímulos producidos por la interacción de los CEM de FEB y los campos de RF modulados por FEB.

Un modelo de cooperativismo en la membrana lo tenemos en la conducta de los iones de calcio enlazados al glicocáliz en la superficie extracelular y a las moléculas de fosfatidilserina y fosfatidilinositol (mono, bi o tri-fosfato) en la superficie citosólica. La aplicación de un CEM provoca una modificación, altamente cooperativa, en el enlace de los iones de calcio por toda la superficie interna y externa de la célula, que conduce a la ruptura de los mismos y a la liberación de calcio libre en ambos medios, extracelular e intracelular (del Moral y Azanza, 1992).

Se han propuesto mecanismos de interacción de los CEM externos, con los osciladores internos celulares, para frecuencias incidentes mucho más bajas que la de los osciladores celulares (amplificación paramétrica). Se ha propuesto que estos procesos pueden conducir a la sincronización de la actividad celular con las fuentes externas, debido a una respuesta aguda en frecuencia, manifestación de un fenómeno

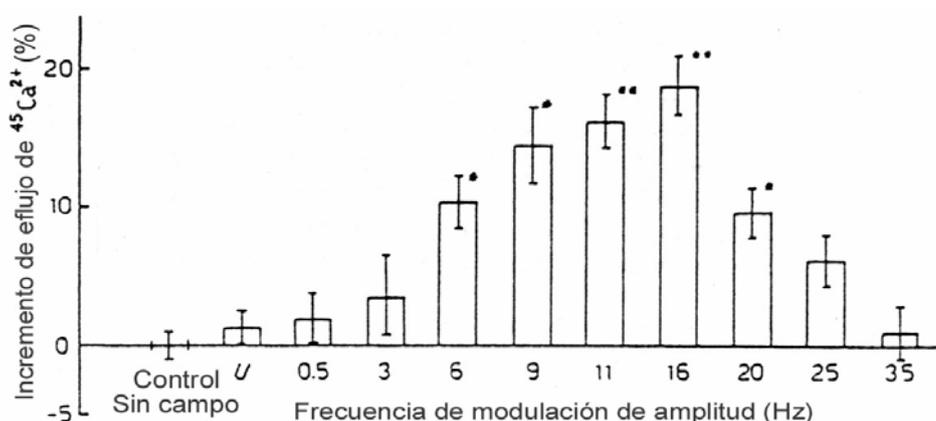
de “ventana” en frecuencia y amplitud (Kaiser, 1984). En resumen, se puede considerar que existen fuertes evidencias de que las membranas biológicas se comportan como amplificadores de alta ganancia de energía para el estímulo débil electroquímico. Las ganancias máximas aparecen para frecuencias en el rango de 0 a 100 Hz, que coinciden precisamente con las frecuencias características de disparo bioeléctrico de las neuronas y de operación de muchas redes neuronales.

Se ha reconocido (Adey, 1989) que los mecanismos estadísticos y de equilibrio termodinámico de la materia viva, son completamente inadecuados para afrontar el problema de las interacciones del CEM de FEB con las células vivas. El problema principal es que la enorme barrera que supone el CE de  $10^5$  V/cm a través de la membrana plasmática, hace que las ecuaciones de equilibrio termodinámico de Hodgkin-Huxley, para la producción del impulso nervioso, sean completamente inadecuadas para explicar la despolarización de la membrana por campos aplicados tan pequeños, en el rango de 0.1 a  $10^{-7}$  V/cm. El estado de mantenimiento de las células en el tiempo, fuera del equilibrio termodinámico, y con carácter dinámico, requiere de ajustes continuos de energía, definiéndose por ello, como procesos disipativos (Adey, 1989). Una consecuencia importante de estos procesos de no-equilibrio, son los subsiguientes procesos de “ventana”. Se ha reconocido ampliamente la necesidad de una “organización molecular especializada” para que se puedan captar los CEM débiles o en general, cualquier estímulo débil de otra naturaleza. Es decir, se necesita que conjuntos o subconjuntos moleculares funcionen con una interdependencia para que sea posible un mecanismo de amplificación.

Los mecanismos no-lineales juegan un papel importante en el acoplamiento de las señales extracelulares con los procesos citosólicos. Existen numerosos ejemplos de la conducta no-lineal en células y tejidos; ésta puede considerarse una propiedad generalizada del funcionamiento de la materia viva.

En los trabajos de Adey (Lawrence y Adey, 1982), Blackman (Blackman et al., 1985 a, b), Liboff (Liboff y McLeod, 1988), y Chiabrera (Chiabrera y Bianco, 1987), se pueden encontrar diversos modelos físicos propuestos para explicar las modificaciones en el comportamiento de los iones de  $Ca^{2+}$  a través de las membranas.

Adey y Blackman introdujeron el concepto de “ventana”, según el cual las modificaciones en los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  se producen para determinados intervalos de frecuencias, en el rango de las FEB (Fig. 1.5). De los modelos propuestos, ha destacado el modelo de resonancia ciclotrónica de Liboff (Liboff et al., 1987) con el cual se trata de explicar las respuestas en ventana o respuestas “resonantes”. Dicho modelo propone que es necesario aplicar un CEM de frecuencia idéntica a la frecuencia ciclotrónica angular de cada uno de los iones involucrados en un proceso transmembrana, para que la energía cedida a los mismos supere las pérdidas energéticas en los canales de membrana y, por un fenómeno de tipo resonante, la resonancia ciclotrónica, los iones puedan desplazarse a través de los canales iónicos. Sin embargo, ninguno de los modelos propuestos explica los efectos biológicos inducidos por exposición a campo magnético de FEB, ni los mecanismos que conducen a la liberación de los iones de calcio enlazados a los sitios combinantes en las membranas. A pesar de que se han llevado a cabo numerosos trabajos, tratando de justificar experimentalmente el modelo de Liboff, éste no explica el mecanismo de interacción de un CM con una membrana biológica.



**Figura 1.5.-** Efecto del cambio de frecuencia de modulación de amplitud entre 0.5 y 35 Hz sobre el eflujo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en el tejido cerebral de pollo. Para la portadora no modulada de 147 MHz (U), los cambios no fueron significativos. Se observa una respuesta máxima para frecuencia de 16 Hz, efecto “ventana” (Bawin et al., 1978).

Las observaciones de ventanas biológicas en las respuestas de células y tejidos a CEM sugieren que la marcada relación frecuencia - respuesta constituye un aspecto importante a tomar en consideración. Las ventanas biológicas se han descrito en el

rango de los mG y a bajas frecuencias (Yost y Liburdy 1992; Fitzsimmons et al., 1993): modulación del  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en células tumorales en cultivo; en linfocitos normales; o cerebro de gato "*in vivo*" durante y después de la exposición a varias frecuencias del CM (Lyle et al., 1991); se han considerado las orientaciones paralela y perpendicular de las componentes alterna y directa del CM para formar combinaciones (Blackmann et al., 1990; Markov et al., 1993). A esto se suma que una amplia variedad de aplicaciones terapéuticas se han desarrollado sobre la base de muchas formas de respuestas en ventana. La significación clínica del fenómeno de ventana es puesta de manifiesto por el hecho de que el tejido óseo responde marcadamente al CM cuando se encuentra dañado y no así el tejido sano circundante (Pienkowski et al., 1992).

Uno de los problemas clave en la comprensión de la interacción de un CM de FEB y baja intensidad con las neuronas, es el desarrollar un modelo físico de interacción del CM con la membrana que pueda explicar tal fenómeno. El descubrimiento de las "ventanas de frecuencia" realizado por Bawin y Adey hace veinte años ha desempeñado un importante papel. Estos autores demostraron que se producía un aumento del eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , en tejido nervioso de mamíferos, alrededor de los 16 Hz, para un ancho de frecuencia de 25 Hz. Esta frecuencia de 16 Hz modulaba a una portadora de RF de 450 MHz, que resultó ser irrelevante en la interacción del CEM con el tejido nervioso.

## 2.- OBJETO DEL TRABAJO

Desde el punto de vista de nuestro estudio los datos experimentales más consistentes a nivel molecular, obtenidos mediante la aplicación de CEM de FEB, en modelos experimentales muy diversos, son los relativos a modificaciones transmembrana en la cinética de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bawin y Adey, 1977; Blackman et al., 1982; Kavaliers y Ossenkopp, 1986; Azanza y del Moral, 1994). La concentración citosólica de calcio regula las actividades de varias moléculas, incluyendo quinasas, fosfatasas y canales iónicos. Este ión actúa como segundo mensajero o efector citosólico en muchos procesos biológicos. Funciones celulares como la excitabilidad de la membrana neuronal; contracción muscular; neurosecreción; activación de la calmodulina; activación de la cadena oxidativa de la mitocondria o de la proliferación celular, entre otras, están directamente relacionadas con las modificaciones de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Madec et al., 2003). Su importancia en la fisiología de la célula resulta de la habilidad que las células tienen de modular las señales del calcio en espacio, tiempo y amplitud y de modificar las señales transmitidas por esta vía (Berridge et al., 2000). Las funciones del calcio han permitido comprender la diversidad de las respuestas biológicas obtenidas bajo exposición a CEM en diversos tipos celulares.

Los experimentos previos realizados en este Laboratorio, junto con el modelo físico desarrollado (del Moral y Azanza, 1992) permitió llegar a la conclusión de que el campo magnético interacciona con la membrana plasmática de las neuronas, produciendo la liberación del calcio enlazado a ambos lados de la membrana (Azanza y del Moral 1994; del Moral et al., 2002). El incremento súbito de la concentración de calcio libre en el citosol promueve respuestas de estimulación o inhibición, altamente específicas, en estirpes celulares diferentes. Es decir, una neurona determinada siempre es estimulada o es inhibida bajo exposición a CM sea estático o alterno. Consideramos que esta conducta hay que buscarla además de en la dependencia de la actividad de cada neurona con respecto al calcio, en la ultraestructura de la membrana plasmática de la neurona en la que se realiza el experimento. El tipo de canales iónicos, su densidad relativa y su disposición en la superficie de la neurona deben ser los determinantes de tales respuestas. Consideramos que las neuronas que

no muestran ser magnetosensibles (18%) son relativamente independientes del calcio en su actividad natural o espontánea. Por otra parte, se ha realizado en este Laboratorio una exploración amplia del efecto del CMA de intensidades comprendidas entre 1-15 mT para frecuencia fija de 50 Hz (Calvo y Azanza, 1999a y 1999b; Azanza et al., 2002b). Con estos antecedentes ha surgido el interés de explorar el posible efecto derivado de la exposición a campo magnético en un amplio rango de frecuencias y baja intensidad.

De acuerdo con estos antecedentes los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1.- Caracterizar los canales iónicos que se expresan en las neuronas de *Helix aspersa*.
- 2.- Estudiar los efectos inducidos por un campo magnético sinusoidal de intensidad en el rango de 0.2  $\mu$ T a 3.5 mT y frecuencia entre 0.1 y 217 Hz, en la actividad bioeléctrica de neuronas de los ganglios cerebroideos de *Helix aspersa*.
- 3.- Determinar si en el rango de frecuencia del campo magnético aplicado se manifiesta el fenómeno de ventana en frecuencia.
- 4.- Analizar la posible modificación de la morfología de los potenciales bioeléctricos bajo nuestras condiciones experimentales.
- 5.- Comprobar la influencia de la temperatura en la actividad bioeléctrica de las neuronas.
- 6.- Desarrollar modelos físicos teóricos que expliquen los resultados obtenidos, siguiendo las pautas del modelo de superdiamagnetismo y explosión coulombiana para la acción de un campo magnético alterno sobre el potencial bioeléctrico.
- 7.- Comparar nuestros resultados con dichos modelos.

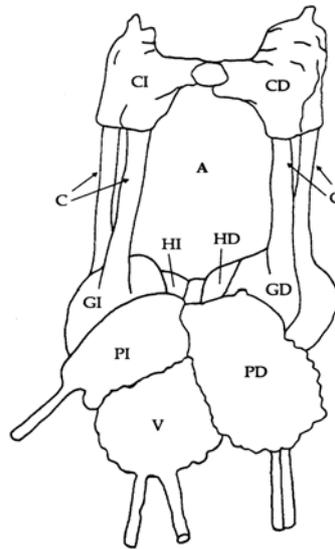
### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.- DISECCIÓN DE LOS GANGLIOS CEREBROIDEOS Y MANTENIMIENTO DE LAS NEURONAS

Los experimentos se han llevado a cabo en neuronas de los ganglios cerebroideos de *Helix aspersa*, mantenidos *in vitro* en solución Ringer de moluscos (NaCl 80mM, KCl 4mM, CaCl<sub>2</sub> 7mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM y tampón Triss-HCl 5mM; pH= 8) enriquecida en ácido pirúvico 10mM, como fuente de energía metabólica. Los especímenes se adquieren en el mercado y se mantienen, en el laboratorio, a temperatura ambiente. Diariamente, los caracoles se sumergen en agua y se les alimenta con lechuga, permitiéndoles que se muevan libremente durante media hora. Hemos observado que, de esta forma, la actividad neuronal se mantiene en condiciones óptimas para la experimentación (Azaña y del Moral, 1988).

El sistema nervioso central de *Helix aspersa* está constituido por varios ganglios cerebroideos, que se localizan en la porción anterior del cuerpo. Estos ganglios muestran la estructura típica de los ganglios presentes en invertebrados, formando dos masas ganglionares, supraesofágica y subesofágica, unidas por comisuras nerviosas, formando el anillo periesofágico (Fig. 3.1). Este nombre se debe a que se disponen alrededor del esófago. La cápsula que rodea los ganglios es de tejido conjuntivo, frecuentemente queda endurecida por depósitos de calcio particularmente en ambientes secos.

Los ganglios supraesofágicos están formados por dos ganglios cerebroideos (CI, CD) de los que parten 11 nervios, entre los que se encuentran los nervios ópticos y los que terminan en el ganglio bucal. Los ganglios subesofágicos tienen un tamaño aproximado de 4 mm<sup>2</sup>, constan de dos ganglios pedios (GI, GD), que inervan el pie locomotor; un ganglio visceral (V), dos ganglios pleurales (HI, HD), de los que parten tres pares de nervios cervicales, que inervan los distintos órganos y dos ganglios parietales (PI, PD) de los que parten tres pares de nervios paleales, que inervan las paredes musculares del cuerpo. Toda la experimentación se ha realizado en los ganglios subesofágicos visceral y parietales derecho e izquierdo.



**Figura 3.1.-** Diagrama de los ganglios cerebroideos de *Helix aspersa*. Los ganglios se han denominado como: cerebroideos, izquierdo (CI) y derecho (CD); pedios, izquierdo (GI) y derecho (GD); pleurales, izquierdo (HI) y derecho (HD); parietales, izquierdo (PI) y derecho (PD) y visceral (V). Las neuronas, objeto de nuestra experimentación, se localizan en PI, PD y V y han sido numeradas para su identificación. C: comisuras, A: anillo periesofágico (modificado de Kerkut et al., 1975).

Una vez realizada la disección, todo el conjunto de ganglios se sumerge en solución Ringer de moluscos, para mantener las células en condiciones fisiológicas óptimas. Los ganglios se visualizan mediante una lupa binocular Olympus SZ. Para retirar el tejido conectivo que los cubre, se utilizan pinzas de punta muy fina de 0.05 mm x 0.02 mm. Debajo de la capa de tejido conectivo, se observan los somas neuronales en la superficie del ganglio. Las neuronas son monopolares y de morfología casi esférica (Fig. 3.2), con el axón dirigido hacia el neuropilo del ganglio (Fig. 4.1). Para observar bien su posición en el ganglio, las neuronas se tiñen con el colorante vital azul de metileno al 0.05%. De esta manera, podemos identificar la neurona que estamos estudiando por su situación relativa en el ganglio y por su tamaño, además de otros detalles que se precisan en el apartado siguiente. No obstante, la localización de una célula determinada varía ligeramente de una preparación a otra y, de hecho, a veces algunas neuronas en concreto parecen faltar en determinados ganglios. Es importante destacar la variedad de tamaños que presentan las neuronas de *Helix aspersa*. En la Tabla 3.1 se muestran los valores del diámetro neuronal de algunas neuronas, las medidas las hemos realizado mediante

un micrómetro de ocular Olympus de sensibilidad  $\pm 1\mu\text{m}$ .



**Figura 3.2.-** Fotografía de la superficie de los ganglios visceral, parietal derecho y parietal izquierdo una vez realizada la disección. Se observa un microelectrodo de los usados en la experimentación (Kerkut et al., 1975). El número de células con las que se ha trabajado en el Laboratorio de Magnetobiología es de aproximadamente 120, las de mayor tamaño y tamaño medio dispuestas en superficie y accesibles a los microelectrodos.

Los ganglios se disponen en una cámara de metacrilato de 4.0 cm de ancho x 5.0 cm de largo x 3.5 cm de alto, que contiene un bloque de parafina inclinado, en el que se apoyan los ganglios. El bloque de parafina permite fijar el electrodo de referencia, el termómetro para controlar la temperatura durante el experimento y disponer los ganglios con la inclinación adecuada para observar en primer plano las neuronas objeto de experimentación, que se visualizan fácilmente mediante una lupa binocular Olympus. La preparación se ilumina con luz fría (Olympus). La cámara de metacrilato esta provista de un sistema de drenaje, a través del cual se puede renovar la solución Ringer durante el desarrollo del experimento.

**Tabla 3.1.-** Medidas del diámetro neuronal, expresado en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), de 18 neuronas de *Helix aspersa*, pertenecientes al ganglio visceral (Azanza et al., 2002b).

NEURONA	DIÁMETRO NEURONAL ( $\pm 1\mu\text{m}$ )
V6	107
V7	78
V13	120
V14	130
V16	77
V20	105
V23	103
V24	88
V35	65
V44	72
V45	134
V46	111
V47	79
V51	92
V52	87
V57	75
V58	80
V59	83

### 3.2.- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS NEURONAS

#### 3.2.1.- TÉCNICAS DE HISTOLOGÍA CONVENCIONAL: MÉTODO DE HEMATOXILINA - EOSINA

En una primera etapa de nuestro trabajo fue preciso realizar una serie de estudios de histología convencional sobre la organización de los ganglios de *Helix aspersa*, con el fin de precisar algunos detalles morfológicos que posteriormente serían de utilidad. Con el método de Hematoxilina-Eosina se tiñe de forma diferencial el citoplasma y el núcleo. La fijación de los ganglios se realiza por inmersión (24 horas) en formalina (al 4%). Una vez fijadas, se lavan las piezas con agua del grifo durante media hora. A continuación se pasan por alcoholes de gradación creciente (70°, 96°, 100°) en dos pases de una hora cada uno. Se realizan dos pases por tolueno de 15 minutos cada uno. Se sumergen en parafina líquida en una estufa (58 °C - 60 °C) durante 18 horas. Se cambia la parafina y se dejan transcurrir 5 ó 6 horas. Se hacen los bloques con

parafina y se dejan enfriar de 18 a 20 horas para que solidifiquen. Los bloques obtenidos por el proceso anterior se cortan con micrótopo de parafina a 4 y 5 micras y se colocan sobre un porta. En este proceso usamos un baño de agua destilada a 37 °C para recoger las secciones sobre los portaobjetos. Se obtienen los cortes seriados que se utilizan para las distintas técnicas.

Las secciones de tejido se desparafinan pasándolas dos veces por xilol (10 minutos). A continuación se hidratan: alcohol absoluto (4 minutos), alcohol de 96° (4 minutos), alcohol de 70° (4 minutos), agua destilada (5 minutos). Hematoxilina 15 minutos, diferenciación en agua (10 - 15 minutos). Contraste en eosina (30 segundos), deshidratación mediante pasos sucesivos por alcoholes de gradación creciente, alcohol de 70° (2 minutos), alcohol de 96° (2 minutos), alcohol absoluto (5 minutos). Se mantienen en xilol mientras se montan con DPX (8711, Difco).

### **3.2.2.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL: MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Con el fin de caracterizar de forma precisa los distintos subtipos celulares, neuronas, y células de glía, de los ganglios cerebroideos, realizamos un estudio ultraestructural de los mismos. Para ello, los ganglios se tallaron en bloques pequeños de 1 mm<sup>3</sup> y se fijaron durante 4 horas, a 4 °C, en solución de glutaraldehído al 2.5% y tampón de Milloning (fosfato monosódico al 2.26%, hidróxido sódico al 2.5%, glucosa al 5.4% y cloruro cálcico al 1 %) a pH=7.3. Las piezas se lavaron 3 veces con tampón de Milloning durante 20 minutos. La postfijación se realizó durante 2 horas, a 4 °C, en el fijador de Palade que contiene una parte de solución de tetróxido de osmio al 2% y una parte de solución de tampón de Palade (acetato sódico al 1.9%, veronal sódico al 2.58%, ácido clorhídrico al 0.1 N). Después de tres lavados de 15 minutos en el tampón de Palade, se procedió a la deshidratación de las piezas mediante acetonas de concentración creciente (30%, 50% y 70%). Tras contraste por impregnación en acetato de uranilo al 70% en acetona fría, las piezas fueron incluidas en araldita, manteniendo una determinada orientación. Los bloques se tallaron en un piramidotomo (LKB11.800) obteniéndose cortes semifinos con un ultramicrótopo (MT-XL, RMC). Los cortes semifinos de 0.5 a 1 µm, se tiñeron con azul de toluidina (agua destilada 50 ml, tetraborato de sodio, 0.5 g, azul de toluidina, 0.25 g) para su observación en el microscopio óptico. Los cortes ultrafinos se recogieron sobre rejillas

de cobre y se tiñeron con citrato de plomo siguiendo el método Reynolds, para ser observados en un microscopio electrónico Jeol 1010.

### **3.2.3.- TÉCNICA DE INMUNOCITOQUÍMICA. MÉTODO ENVISIÓN<sup>®</sup>, UTILIZADO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE CANALES IÓNICOS**

EnVisión<sup>®</sup> es un método de alta sensibilidad, desarrollado por la casa Dako, que puede aplicarse de forma rutinaria tanto en secciones de tejido, incluidas en parafina, como en secciones de tejido congelado e incluso en células procedentes de cultivos. La técnica EnVisión<sup>®</sup>, está basada en un único enzima conjugado con un polímero vertebrado de gran tamaño, el cual amplía enormemente el marcaje. La biotina endógena no afecta los resultados de la reacción.

Todos los anticuerpos primarios utilizados son policlonales Rabbit - AntiCow. Las diluciones para obtener las soluciones madre se han obtenido a partir del preparado comercial de cada anticuerpo en PBS (Buffer fosfato: 87.9 g de NaCl, 2.72 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anhidro, 11.35 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, en 10 litros de agua destilada, pH (7.1 - 7.4)) o en diluyente para anticuerpos Dako (Ref. S2022). Las soluciones madre utilizadas fueron:

- Conexina 26: concentración 1/100 (Chemicon, AB 1717).
- Canales de Na<sup>+</sup> operados por voltaje: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5206).
- Canales de Ca<sup>2+</sup> operados por voltaje de tipo N: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5154).
- Canales de Ca<sup>2+</sup> operados por voltaje de tipo P/Q: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5152).
- Canales de K<sup>+</sup> operados por voltaje de rectificación retardada: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5182).
- Canales de K<sup>+</sup> de pequeña conductancia, dependientes de Ca<sup>2+</sup> intracelular, SK2: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5356).
- Canales de K<sup>+</sup> de alta conductancia, dependientes de Ca<sup>2+</sup> intracelular, BK<sub>Ca</sub>: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5228).
- Canales de Ca<sup>2+</sup> operados por voltaje de tipo L: concentración 1/100 (Chemicon, AB 5156).

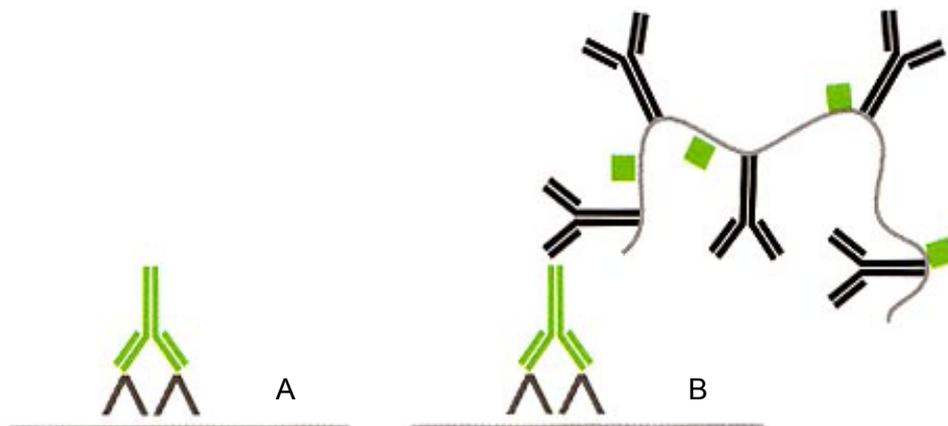
Las alícuotas de las soluciones de trabajo, a partir de la solución madre, se han preparado utilizando como diluyente el específico de la casa Dako. Las concentraciones de trabajo fueron:

- Conexina 26: concentración 1/1000.
- Canales de  $\text{Na}^+$  operados por voltaje: concentración 1/200.
- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje de tipo N: concentración 1/300.
- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje de tipo P/Q: concentración 1/300.
- Canales de  $\text{K}^+$  operados por voltaje de rectificación retardada: concentración 1/200.
- Canales de  $\text{K}^+$  de pequeña conductancia, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, SK2: concentración 1/300.
- Canales de  $\text{K}^+$  de alta conductancia, dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ : concentración 1/200.
- Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje de tipo L: concentración 1/1000.

El método se desarrolla en dos etapas (Fig. 3.3):

Etapa 1. - Aplicación del anticuerpo primario. Incubación 10 - 30 minutos.

Etapa 2. - Aplicación de EnVisión<sup>®</sup>. Incubación de 10 - 30 minutos.



**Figura 3.3.-** A: etapa 1, aplicación del anticuerpo primario, incubación 10 - 30 minutos. B: etapa 2, aplicación del EnVisión<sup>®</sup>, incubación de 10 - 30 minutos. (DakoCytomation, Cat. 2004 - 2005).

Una molécula de antígeno (Ag) fijará una molécula de anticuerpo (Ac) que está conjugada con una molécula de peroxidasa (PO). Tras la incubación, la exposición a 3,3'-diaminobencidina tetraclorhídrico (DAB,  $C_{12}H_{14}N_4HCL$ ) muestra la existencia del Ag por un marcaje coloreado de marrón, visible al microscopio óptico. La peroxidasa catalizará la descomposición del agua oxigenada y, el oxígeno libre que se produce es el que oxida a la DAB produciendo un depósito de óxido de diaminobencidina de color marrón.

El método EnVisión<sup>®</sup> emplea un desenmascaramiento con tampón citrato, a fin de liberar el antígeno que haya podido ser atrapado por el fijador antes de la aplicación del anticuerpo primario. El revelado se lleva a cabo mediante el reactivo EnVisión<sup>®</sup> SRP que contiene complejo de dextrano con moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulinas de conejo o ratón, además la solución contiene proteínas estabilizantes y conservantes. Posteriormente se realiza el revelado con DAB que por ser tóxica requiere la utilización de material de protección adecuado. La DAB se prepara a partir de un Kit de Dako (Ref. K5007) tomando por cada  $\mu$ l de cromógeno (3,3'-diaminobenzidina tetraclorhídrico en disolvente orgánico). El color de este reactivo puede variar de violeta fuerte a incoloro, 1ml de Buffer contiene peróxido de hidrógeno y conservantes.

Se ha utilizado como bloqueante buffer con BSA, constituido por PBS (1 litro), 0.25% BSA, 2% Tritón x100. El bloqueante es BSA mientras que el Tritón x100 se utiliza para aumentar la permeabilidad de las membranas.

El protocolo seguido fue:

1. Se ponen los portaobjetos con las secciones de tejido media hora en una estufa a 56 °C.
2. Se desparafinan y rehidratan: xilol (dos pasos de 10 min. cada uno), alcohol absoluto (4 min.), alcohol de 96° (4 min.), alcohol de 70° (4 min.), alcohol de 30° (4 min.) y agua destilada (5 min.).
3. Desenmascaramiento con olla a presión. Se ponen dos litros de tampón citrato (Dako Ref. S2031) al 10% en agua destilada. Se introduce el cestillo con los portaobjetos cuando comienza a hervir, se cierra y esperan 3 min. Se enfría con agua del grifo y se deja 20 min. a temperatura ambiente.

4. Se lavan con PBS, dos lavados de 3 min. cada uno.
5. Se secan los portaobjetos y se bloquea la peroxidasa endógena con bloqueante (Dako Ref. S2001) colocando una gota encima de cada sección y se deja actuar 20 min.
6. Se retira el bloqueante
7. Se lavan los portaobjetos con agua destilada.
8. Se lavan con PBS, dos lavados de 3 min. cada uno.
9. Se repite el bloqueo de la peroxidasa endógena (pasos 5, 6 y 7).
10. Se secan los portaobjetos y se colocan unas gotas del anticuerpo primario sobre las secciones. Se dejan incubar 30 min.
11. Se lava en buffer bloqueante, dos lavados de 3 min. cada uno.
12. Revelado mediante EnVisión<sup>®</sup> (Dako Ref. K5007). Incubar 30 min.
13. Se lava con PBS, dos lavados de 3 min. cada uno.
14. Revelado mediante DAB. Se coloca una gota sobre cada muestra y se dejan transcurrir 10 min.
15. Se lava 2 veces con agua destilada.
16. Se contrasta con hematoxilina de Harris durante 10 min. Si es de Mayers 5 min.
17. Se diferencia con agua del grifo que dejamos correr unos 15 min.
18. Se deshidrata: alcohol de 30° (2 min.), alcohol de 70° (2 min.), alcohol de 96° (2 min.), alcohol absoluto (5 min.). Pasar por xilol.
19. Se monta con DPX y se observa al microscopio óptico.

### 3.3.- OBTENCIÓN DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS Y APLICACIÓN DE CAMPO MAGNÉTICO

#### 3.3.1.- OBTENCIÓN DE REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

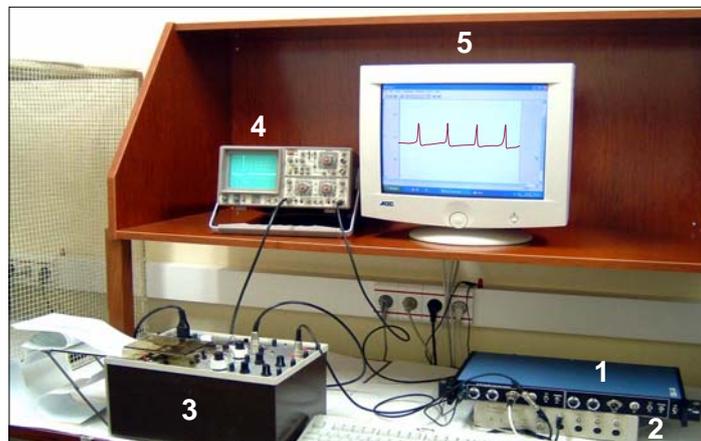
Los registros electrofisiológicos se realizan usando microelectrodos de vidrio con filamento interno, rellenos de una solución 1M de acetato de potasio pH=6.8. La punta del microelectrodo tiene un diámetro inferior a  $0.5 \mu\text{m}$  y su resistencia oscila entre 2 y  $20 \text{ M}\Omega$ . Los microelectrodos de vidrio, a diferencia de los metálicos, no son polarizables y, por tanto, no tienden a acumular carga residual en su punta. Se utiliza como solución conductora acetato de potasio en lugar de cloruro sódico o potásico; el mayor tamaño de los iones evita que difundan hacia el citoplasma neuronal a través de la punta del microelectrodo. Los microelectrodos se construyen por estiramiento a partir de varillas de vidrio GB 200 F8P (Biologic) de diámetro externo 2 mm. e interno 1.56 mm. ( $d_i/d_e = 0.78$ ). En la Fig. 3.4 se muestra el equipo (Narishige PE-2) utilizado para el estiramiento de los microelectrodos.



**Figura 3.4.-** Estirador de microelectrodos. Variando los parámetros de temperatura del filamento y solenoide se obtienen los electrodos con las formas de punta y resistencias adecuadas para la realización de los registros electrofisiológicos.

Los experimentos se realizan a temperatura ambiente ya que los moluscos son poiquiloterms. En primavera y otoño la temperatura del laboratorio oscila entre 21 y 23 °C y en verano entre 22 y 25 °C. La temperatura del baño se controla continuamente mediante un termómetro sumergido en la solución Ringer (Fig. 3.8).

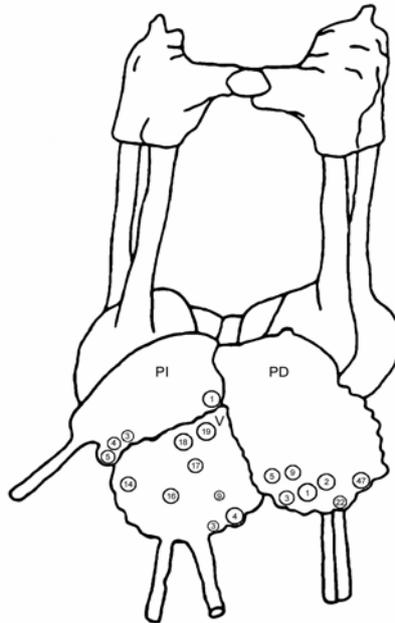
En los primeros experimentos realizados, los potenciales bioeléctricos se amplificaron utilizando un preamplificador (Palmer BioScience 5176) y amplificador (Palmer BioScience 6132), y se visualizaron en un osciloscopio HM 205 Hameg. Los registros permanentes se obtuvieron con un registrador gráfico Washington 400MD2C de Palmer BioScience (Fig. 3.5). Posteriormente, se sustituyó el amplificador Palmer por un amplificador VF 102 (Biologic), que permite procesar las señales bioeléctricas mediante el equipo PowerLab 4SP (ADInstruments) (Fig. 3.5). Este montaje experimental permite registrar los potenciales bioeléctricos simultáneamente con el registrador gráfico y en el ordenador. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizan utilizando el programa profesional Chart 4.1.2 para Windows (Fig. 3.5).



**Figura 3.5.-** Vista general del bloque fundamental de registro formado por: (1) amplificador VF 102 Biologic; (2) PowerLab 4SP ADInstruments; (3) registrador gráfico Washington 400MD2C Palmer BioScience; y (4) osciloscopio HM 205 Hameg; (5) ordenador Pentium IV con programa profesional Chart 4.1.2 para el control del PowerLab.

Antes de iniciar los experimentos, se deja transcurrir media hora para que se estabilicen las concentraciones iónicas transmembrana, y por tanto, la actividad electrofisiológica natural de las neuronas tras la manipulación realizada durante la disección. Los registros electrofisiológicos desde neuronas individuales en tiempo real, implican controles experimentales específicos para esta metodología. La caracterización de la actividad espontánea neuronal constituye el *registro control*, que servirá de referencia para definir las posibles modificaciones de las variables en estudio para cada experimento que se realiza. No obstante, debido a los años de experiencia en el Laboratorio de Magnetobiología, se dispone de registros previos de la mayor parte de las neuronas objeto de este estudio, por lo que se puede considerar que la actividad espontánea de las mismas está bien establecida. El experimento se repite una media de cinco veces para cada tipo de neurona testada, y desde especímenes diferentes. De esta forma se mantiene la siguiente pauta de experimentación: *un espécimen, una neurona, un experimento*. Hemos mantenido esta pauta de experimentación debido a que, una vez aplicado el campo magnético, todas las neuronas de los ganglios están expuestas al mismo y únicamente tenemos referencia de la actividad espontánea de una neurona, en el conjunto de los ganglios, aquella en la que hemos introducido el microelectrodo de registro.

En cada grupo de experimentos, se escogen inicialmente las neuronas de forma aleatoria. Una vez observadas las diferentes respuestas inducidas, se seleccionan neuronas determinadas para realizar los experimentos de forma repetitiva y caracterizar, de esta forma, la naturaleza de la respuesta. El criterio que se sigue para seleccionar estas neuronas es que, ya sean neuronas de actividad bioeléctrica continuada o neuronas silenciosas, la actividad espontánea debe reflejar unas condiciones funcionales óptimas para proseguir con el experimento. Se tiene en cuenta que el efecto inducido sea repetitivo y constante (respuestas de estimulación o inhibición); fácil de definir (respuestas en frecuencia y/o amplitud); y que exista una relación estímulo/respuesta. Todos estos datos nos aportan la información necesaria para identificar cada neurona estudiada y, de esta forma, poder elaborar el mapa de los ganglios, en el que se localicen las neuronas objeto de nuestro estudio (Fig. 3.6).



**Figura 3.6.-** Mapeado de los ganglios de *Helix aspersa*. Las neuronas que se muestran se han numerado para su identificación. Son las neuronas que se presentan en la memoria y constituyen una muestra del total de las neuronas con las que se han realizado experimentos de exposición a campo magnético de diferentes intensidades y frecuencias.

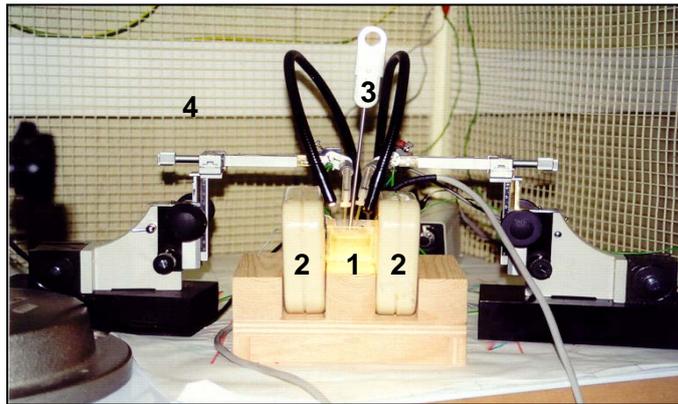
### 3.3.2.- APLICACIÓN DE CAMPO MAGNÉTICO

Los equipos utilizados para generar el campo magnético alterno (CMA) son los siguientes: una fuente estabilizadora MANUMAG; un generador de funciones 2500.50 de SF, de amplia versatilidad, que permite fijar la forma de onda (sinusoidal, triangular o cuadrada), frecuencia e intensidad del campo magnético utilizado y un multímetro digital (34401A Agilent) para monitorizar continuamente la corriente eléctrica que alimenta al sistema magnético (Fig. 3.7).



**Figura 3.7.-** Equipos utilizados en la experimentación: (1) fuente estabilizadora MANUMAG; (2) generador de funciones 2500.50 SF; y (3) multímetro digital 34401A Agilent.

Para estudiar el efecto del campo magnético, la cámara de metacrilato con los ganglios se dispone entre dos bobinas Helmholtz de 11 cm de diámetro separadas entre sí 5.5 cm, con el fin de conseguir un campo magnético alterno homogéneo en el centro de las mismas (Fig. 3.8).



**Figura 3.8.-** (1) cámara de metacrilato donde se disponen los ganglios sumergidos en solución Ringer; (2) bobinas Helmholtz generadoras del CMA; (3) termómetro que se sumerge en el Ringer para medir la temperatura del baño durante el experimento; y (4) jaula de Faraday donde se coloca todo el equipamiento.

El campo magnético alterno se calibra en el centro de las bobinas mediante una sonda de efecto Hall (Magnet-Physik) de sensibilidad  $100 \pm 10 \mu\text{T}$  (Fig. 3.9).



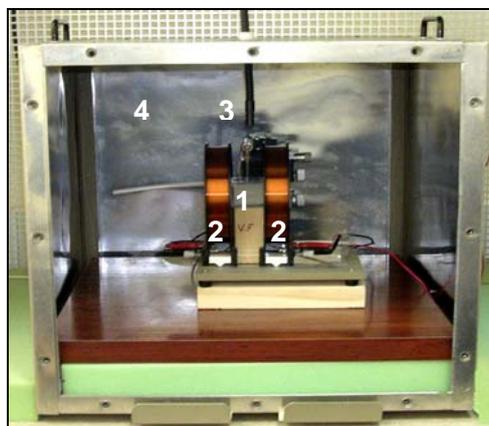
**Figura 3.9.-** Sonda de efecto Hall utilizada en la calibración del campo magnético alterno generado por las bobinas de Helmholtz.

Las bobinas se disponen de forma que el CMA se aplica en la dirección perpendicular a las líneas del campo geomagnético (CGM), es decir en dirección este-oeste, donde su componente horizontal posee valor nulo (Fig. 3.10). De esta forma, se estandarizan los experimentos en relación con la aplicación del CMA.



**Figura. 3.10.-** Valor nulo del CGM, en la dirección este-oeste, en la que se aplica el CMA. La medida se realizó con ayuda de un magnetómetro Fluxgate FGM - 4D2TN, Walker (sensibilidad de 0.01 mG).

La puesta a punto de una instalación experimental, que satisface nuevas exigencias experimentales, ha facilitado la realización de estudios usando campos magnéticos de intensidades y frecuencias aún más bajas. El sistema magnético, formado por un par de bobinas Helmholtz, diseñado para estos fines (Fig. 3.11), y el apantallamiento, que incluye la incorporación de una cámara de mumetal ( $Ni = 76.6\%$ ,  $Fe = 14.7\%$ ,  $Cu = 4.5\%$  y  $Mo = 3.3\%$ ) dotada de cierre total, garantizan estas condiciones (Fig. 3.12).

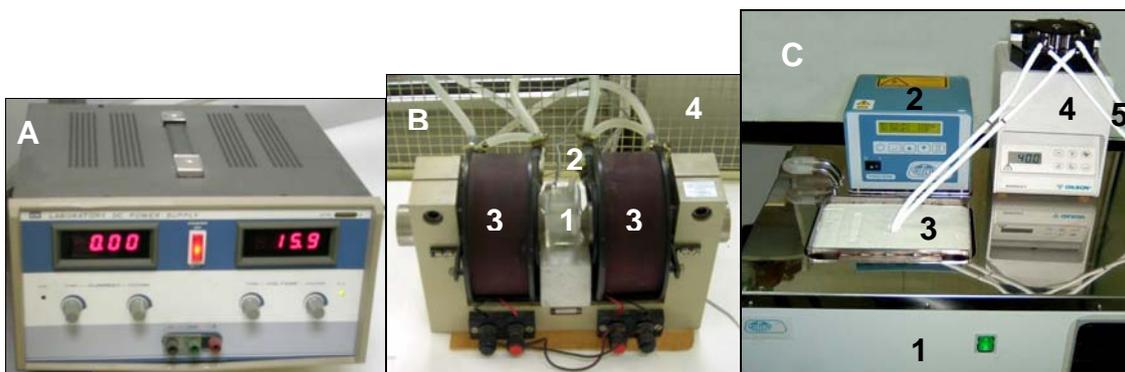


**Figura 3.11-** (1) cámara de metacrilato donde se disponen los ganglios sumergidos en solución Ringer; (2) bobinas Helmholtz generadoras del CMA; (3) terminal de fibra óptica para enfocar la luz; y (4) cámara de mumetal para mejorar el apantallamiento magnético.



**Figura. 3.12.-** Instalación experimental formada por una cámara de mumetal (1). Con esta configuración se logra reducir la contaminación electromagnética ambiental. Los valores de las componentes continua y variable del CM en el interior ( $0.24$  y  $0.14 \mu\text{T}$ ) y el exterior ( $30.28$  y  $0.30 \mu\text{T}$ ) respectivamente, muestran que el grado de apantallamiento es mayor para la componente estática.

Finalmente con el objetivo de estudiar el efecto de la variación de la temperatura en condiciones de exposición a campo magnético se montó la instalación experimental que se muestra en la Fig. 3.13. Los tres bloques fundamentales de la instalación experimental son: (A) fuente de corriente eléctrica que alimenta al electroimán; (B) electroimán con núcleo de hierro que se usa para generar el campo magnético y (C) sistema para el bombeo y control de temperatura de la solución Ringer.



**Figura. 3.13.-** A: fuente de corriente eléctrica (GW). B: (1) cámara de metacrilato donde se disponen los ganglios sumergidos en solución Ringer; (2) termómetro que se sumerge en el Ringer para medir la temperatura del baño durante el experimento; (3) electroimán con núcleo de hierro (Oxford Instruments); (4) jaula de Faraday. C: (1-2) termostato con controlador de temperatura (Selecta); (3) depósito de solución Ringer; (4) bomba peristáltica (Gilson); y (5) conductos por el que circula la solución Ringer, a temperatura controlada, hasta la cámara de metacrilato.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- MODELO EXPERIMENTAL

El modelo experimental utilizado es idóneo para estos estudios, en primer lugar, por la estabilidad de las neuronas puesta de manifiesto en los experimentos de larga duración, de hasta cerca de 6 horas, en los que la actividad electrofisiológica neuronal se ha mantenido en condiciones óptimas. Por otro lado, las neuronas de *Helix aspersa* muestran respuestas constantes frente al CM aplicado. Es decir, un tipo determinado de neurona muestra una actividad bioeléctrica en la que por su amplitud, frecuencia y trazado se pueden reconocer, en experimentos repetidos en días distintos, desde especímenes diferentes. Estos parámetros nos permiten identificar cada neurona, asignándole un número determinado, en función de su actividad espontánea y su respuesta frente al CM además de por su posición y tamaño relativo. La morfología y, relativamente gran tamaño de las neuronas de *Helix aspersa* (entre 20 y 134  $\mu\text{m}$ ) facilitan la obtención de registros electrofisiológicos intracelulares en tiempo real. Son neuronas monopolares, carentes de ramificaciones dendríticas. Los controles de temperatura realizados en los experimentos muestran que la aplicación del CMA, en los rangos de frecuencia e intensidad estudiados, no induce modificaciones de la temperatura ( $\pm 1$  °C) de la solución Ringer. Es decir, los efectos inducidos por el CMA aplicado hay que considerarlos de naturaleza no térmica.

### 4.2.- CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS

La posibilidad de reconocer una neurona determinada nos ha permitido repetir los experimentos en especímenes diferentes. En la Figura 3.6, se muestra un mapa esquemático de los ganglios, en el que se ha representado la localización aproximada de las neuronas estudiadas.

Los criterios que se siguen para identificar una neurona en los ganglios cerebroideos de *Helix aspersa* son los siguientes:

- Posición relativa en el ganglio en relación con las neuronas próximas.
- Tamaño relativo respecto a las neuronas próximas.
- Color que adquiere una vez teñida con el colorante vital azul de metileno.
- Características de la actividad neuronal espontánea definida por los siguientes

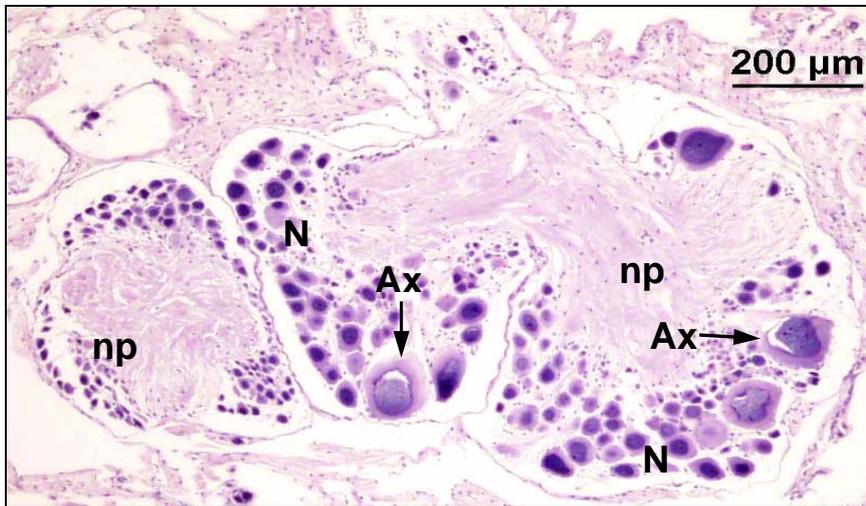
parámetros: tipo de trazado, valor en milivoltios (mV) del potencial de membrana en reposo ( $V_m$ ); amplitud de los potenciales, en mV; amplitud de las hiperpolarizaciones, en mV; frecuencia de disparo, expresada en número de potenciales por minuto o segundo, registro de PEPS (potenciales excitadores postsinápticos) y/o PIPS (potenciales inhibidores postsinápticos); características morfológicas de los potenciales en ráfaga observados durante varios minutos.

Cuando se introduce un microelectrodo en una neurona, se induce un estímulo mecánico que produce una respuesta bioeléctrica, dándonos la certeza de que el microelectrodo se encuentra dentro del soma neuronal. De acuerdo con las características de disparo, las neuronas se clasifican en dos grandes grupos: neuronas de *actividad bioeléctrica continuada*, que mantienen su actividad bioeléctrica durante largo tiempo (registros control de hasta 6 horas de duración sin renovar la solución Ringer), neuronas *silenciosas*, que mantienen su actividad bioeléctrica durante unos segundos o minutos, tras los cuales, dejan de emitir potenciales bioeléctricos, obteniéndose un registro plano en el valor de  $V_m$ .

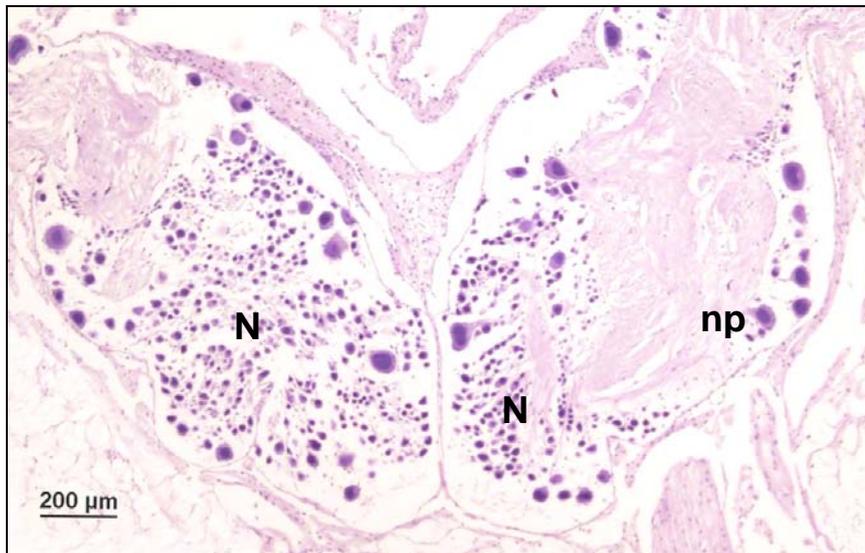
### 4.3.- MORFOLOGÍA DE LAS NEURONAS DE *HELIX ASPERSA*

#### 4.3.1.- MÉTODO DE HEMATOXILINA - EOSINA

El método de Hematoxilina - Eosina nos permite distinguir la localización de las neuronas (N) en la periferia de los ganglios, la disposición de los axones (Ax) y de las fibras en el neuropilo (np), los tamaños relativos de las distintas neuronas y las modificaciones que se observan en su disposición y número relativo en secciones sucesivas de tejido, siguiendo el eje anteroposterior de los ganglios (Fig. 4.1 y Fig. 4.2).



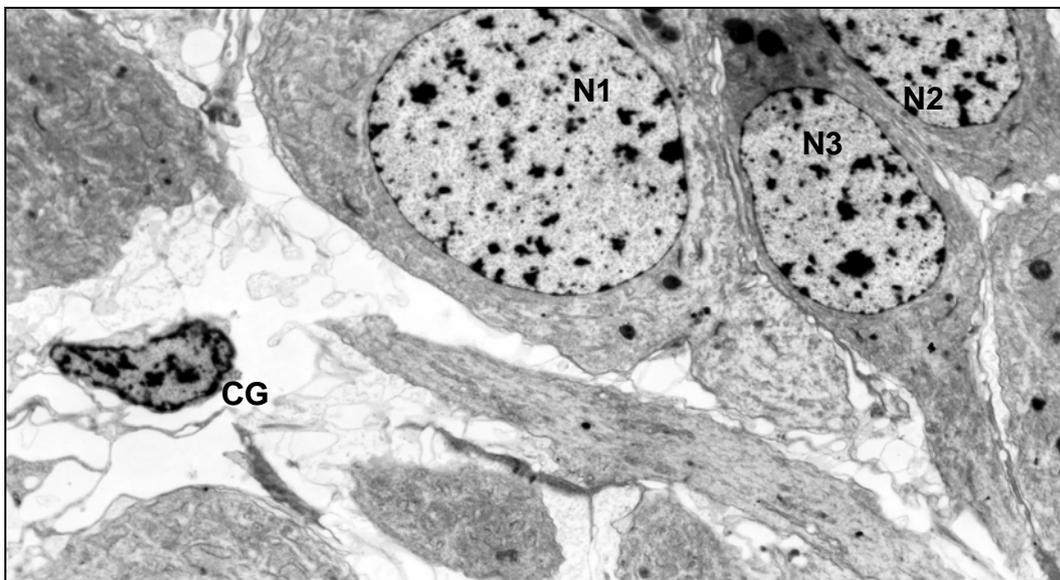
**Figura 4.1.-** Hematoxilina - Eosina 4X. Ha 46. N: neuronas. np: neuropilo. Ax: Axones.



**Figura 4.2.-** Hematoxilina - Eosina 4X. Ha 46. N: neuronas. np: neuropilo.

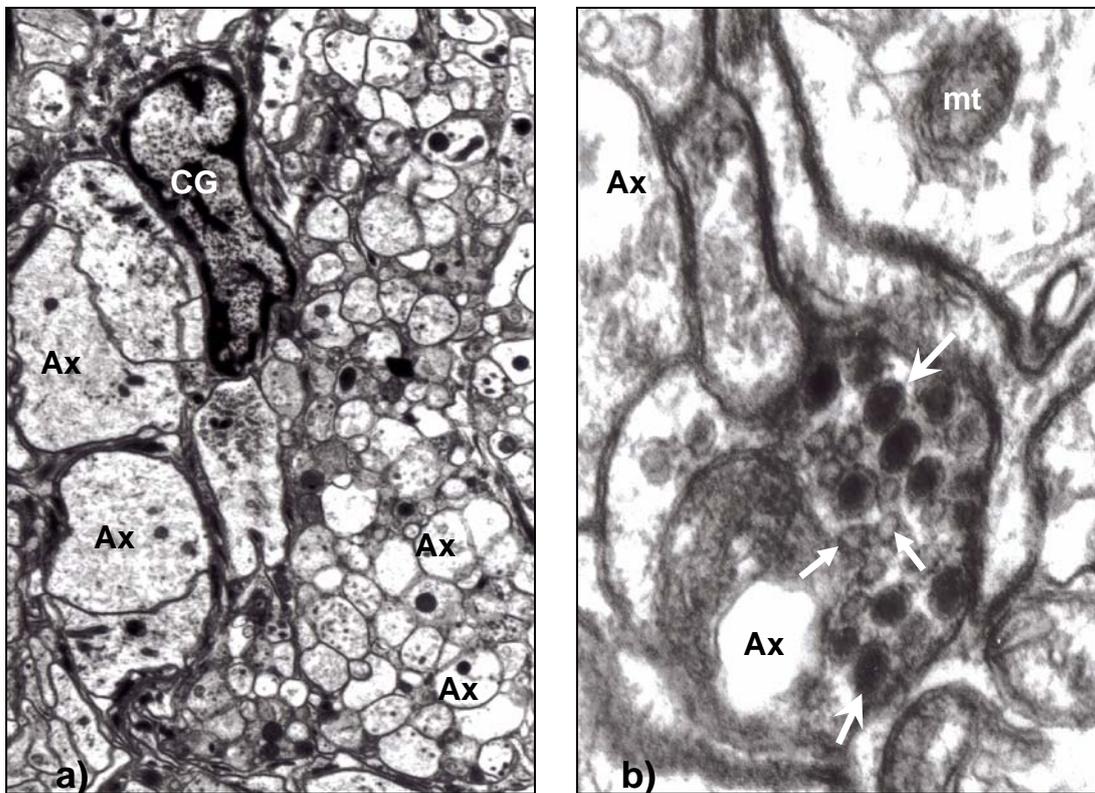
#### 4.3.2.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA: ULTRAESTRUCTURA

El estudio ultraestructural muestra que las neuronas presentan un núcleo voluminoso de forma redondeada u ovalada, con heterocromatina condensada en pequeños grumos dispersos en toda su superficie. Su citoplasma se dispone de forma concéntrica al núcleo, extendiéndose únicamente en la dirección del cono axónico (Fig. 4.3).



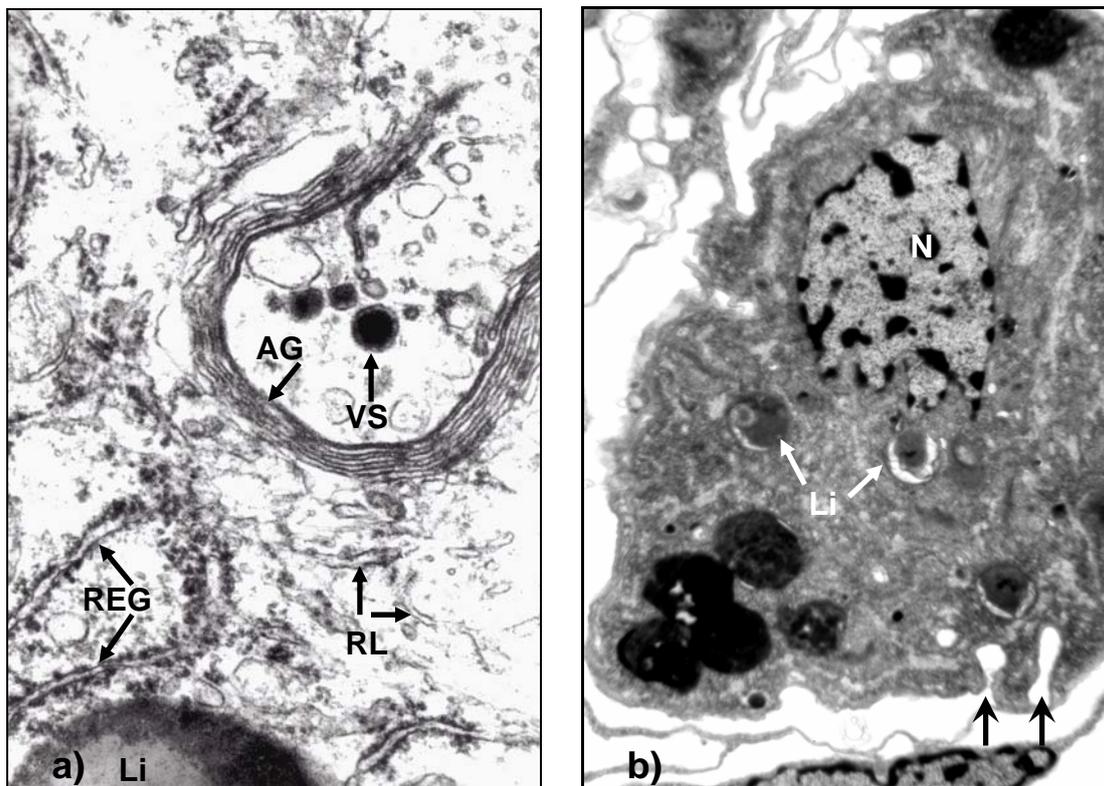
**Figura 4.3.-** M.E. 1500X. Panorámica de un ganglio de *Helix aspersa*. Se observan los núcleos de las neuronas (N1, N2, N3) mostrándose en esta última el cono axónico. CG: célula glial.

Los conos axónicos se orientan hacia el neuropilo, de forma que los axones provenientes de neuronas distintas se disponen en paralelo para formar gruesos troncos nerviosos (Fig. 4.4a). En el interior de los axones se pueden observar mitocondrias, microtúbulos y vesículas sinápticas, fundamentalmente vesículas pequeñas y electronclaras de tipo colinérgico, junto con vesículas de mayor tamaño electrondensas, con un pequeño halo claro por debajo de la membrana, que por su morfología asumimos de tipo peptidérgico (Fig. 4.4b).



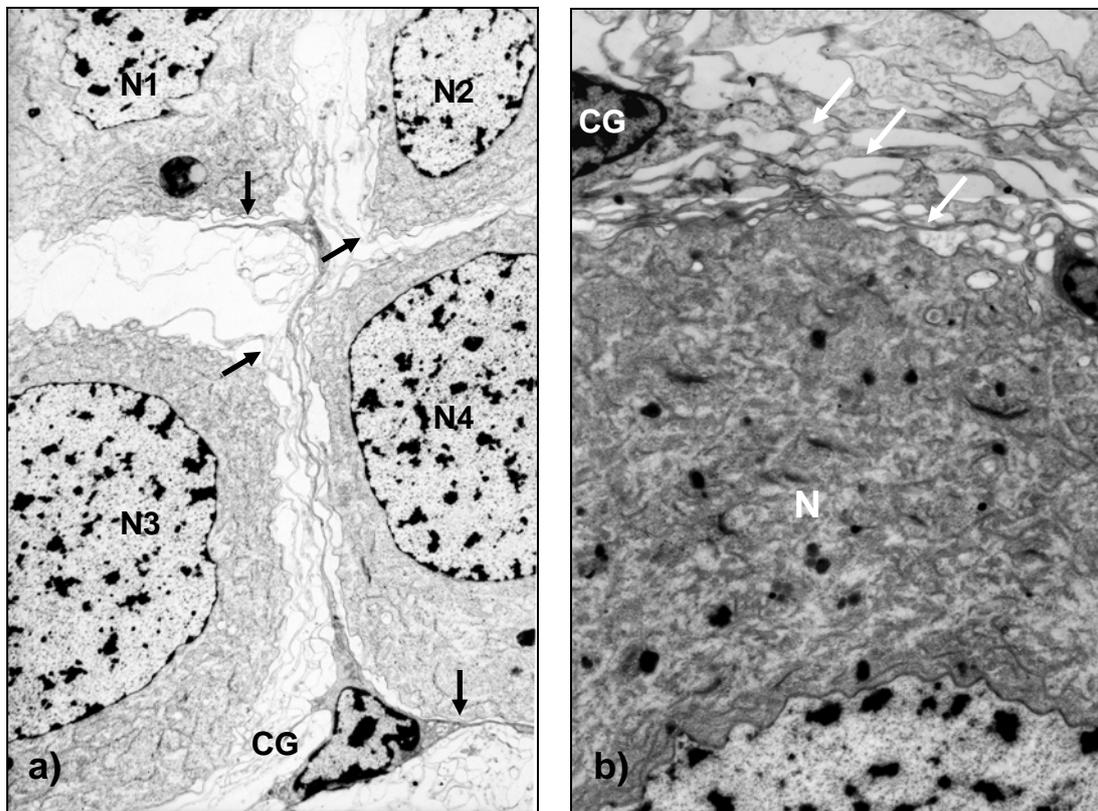
**Figura 4.4.-** M.E. a) 4000X. Corte transversal de un tronco nervioso con axones (Ax) de diversos calibres. Obsérvese núcleo de una célula glial (CG) y como las prolongaciones citoplasmáticas se extienden rodeando a los axones. b) 50.000X. Grupo de axones (Ax), uno de ellos de tipo mixto presentando vesículas de tipo colinérgico (→) y peptidérgico (→). mt: mitocondria.

En el citoplasma neuronal, observamos una disposición típica de los orgánulos celulares: mitocondrias, retículo endoplasmático liso, retículo endoplasmático granular y dictiosomas de Golgi (Fig. 4.5a), siendo muy notable la presencia de abundantes lisosomas y cuerpos residuales (Fig. 4.5b).



**Figura 4.5.-** M.E. a) 40.000X. Detalle de la disposición de los orgánulos neuronales. Obsérvese la relación funcional retículo endoplasmático granular (REG) - Aparato de Golgi (AG). VS: vesículas de secreción. RL: retículo liso. Li: lisosoma. b) 5000X. Panorámica de una neurona en la que se observan grandes lisosomas (Li). Nótese las invaginaciones de la membrana plasmática (→). N: núcleo de neurona. CG: célula glial.

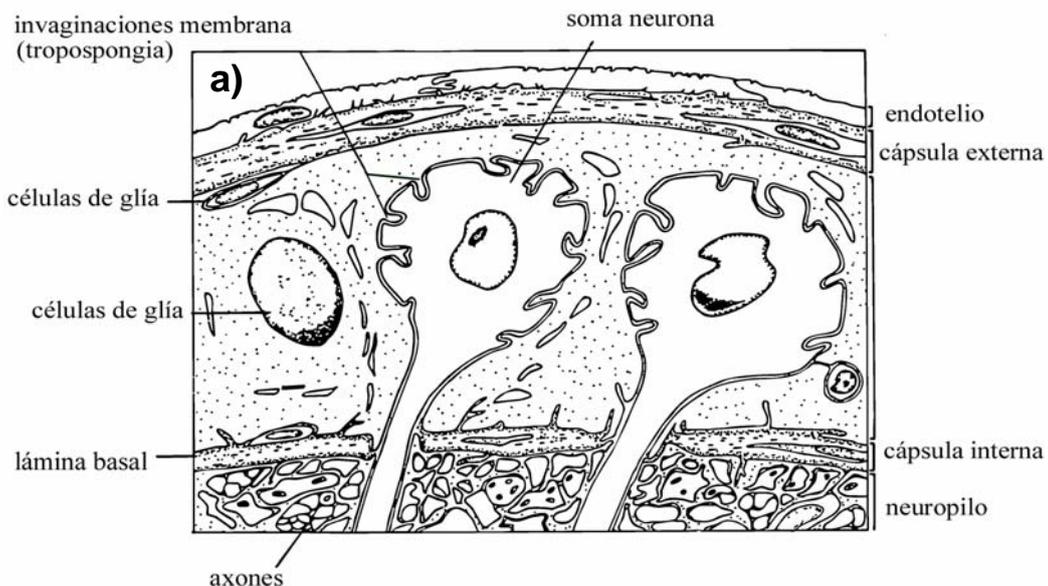
Los ganglios cerebroideos de moluscos no se encuentran vascularizados, por lo que el transporte de metabolitos se realiza a través de la lámina basal de los ganglios y de la capa interna de tejido conectivo que encapsula el conjunto de la masa ganglionar. En el interior de los ganglios, las neuronas, especialmente las más grandes, están aisladas entre sí y con respecto a la lámina basal, mediante células de glía (Fig. 4.6a).



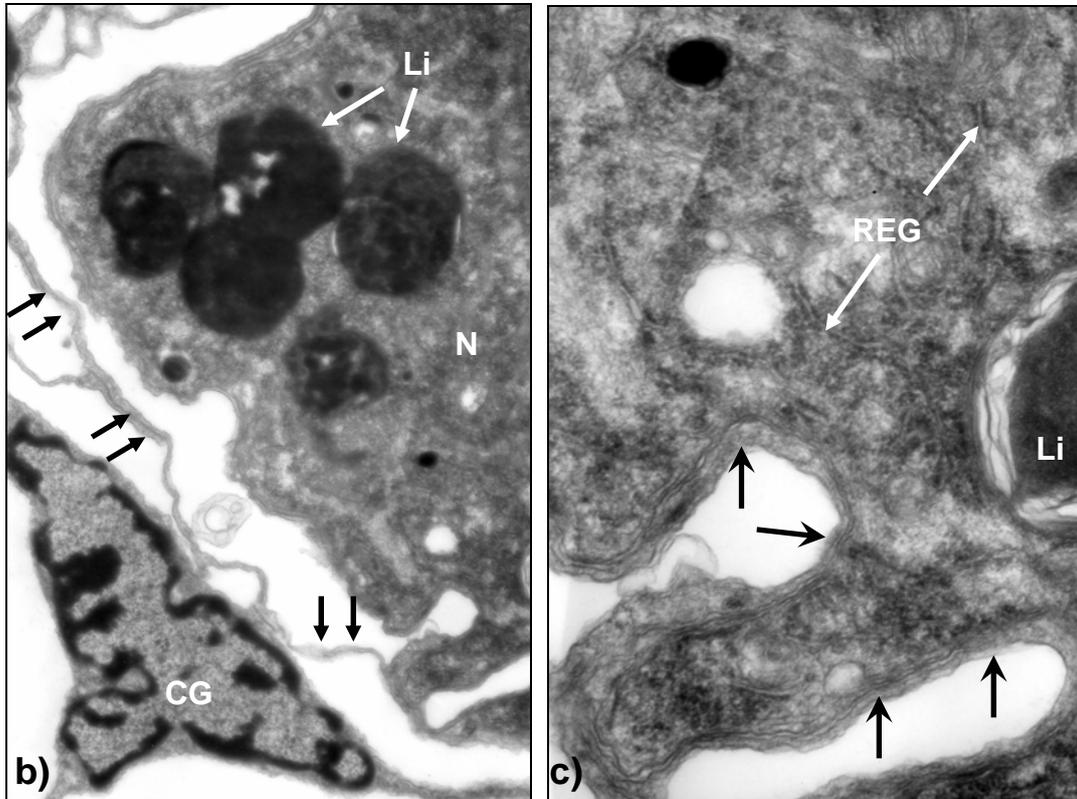
**Figura 4.6.-** M.E. a) 3000X. Relación entre las células gliales y las neuronas. Obsérvese como una sola célula glial (CG) contacta a la vez con cuatro neuronas (N1 - N4). b) 3000X. Las prolongaciones de las células gliales (CG) se disponen formando una superposición de finas membranas (→).

Hemos reconocido dos tipos de células de glía:

1. El primer tipo, son las células que establecen contacto de forma directa con el soma de las neuronas (Fig. 4.6b). Los núcleos de estas células presentan formas triangulares o alargadas (Fig. 4.6a), la heterocromatina se dispone en grumos dispersos en el interior del núcleo, formando una estrecha franja de cromatina marginal. El citoplasma de estas células se extiende en finas prolongaciones citoplasmáticas, que se disponen rodeando al soma neuronal en una estructura característica denominada *tropospongia* (Fig. 4.7a y Fig. 4.7b). Las prolongaciones de estas células gliales pueden recubrir las invaginaciones que se producen en la membrana plasmática neuronal adosándose a ella (Fig. 4.7c).
2. El segundo tipo de células de glía se dispone penetrando por los intersticios axonales. Estas células presentan núcleos alargados con heterocromatina marginal. Su citoplasma se extiende en largas prolongaciones que se ramifican para llegar hasta el interior del tronco nervioso y rodear a grupos de axones. Estos procesos citoplasmáticos presentan elevada electrondensidad y en ellos distinguimos abundantes gránulos electrondensos (Fig. 4.5a).



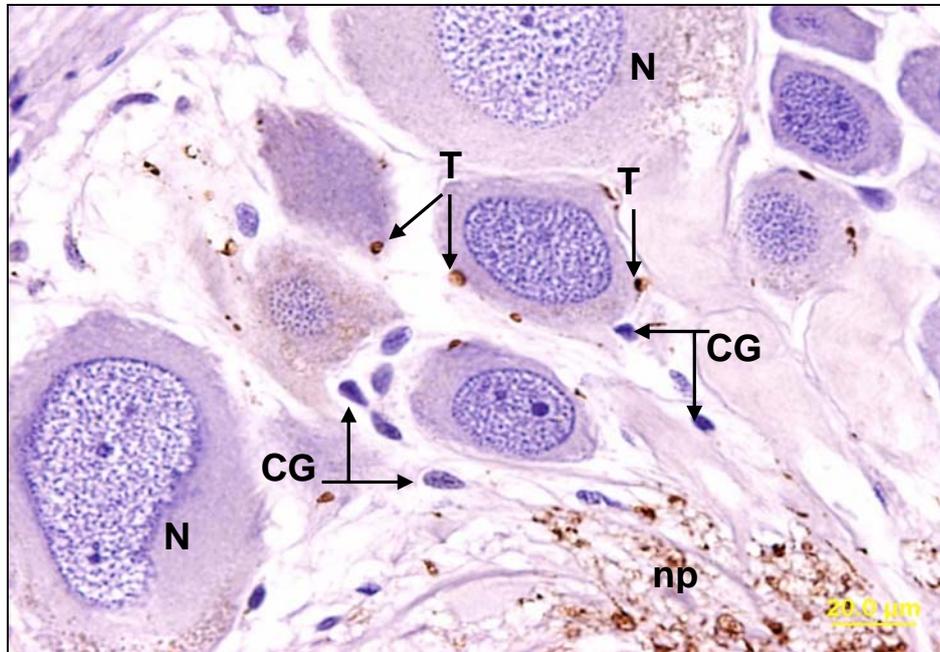
**Figura 4.7a.-** Esquema que muestra invaginaciones de la membrana plasmática neuronal. Las imágenes de microscopía electrónica muestran con frecuencia expansiones de las células de glía que penetran en las mismas formando la estructura definida como tropospongia.



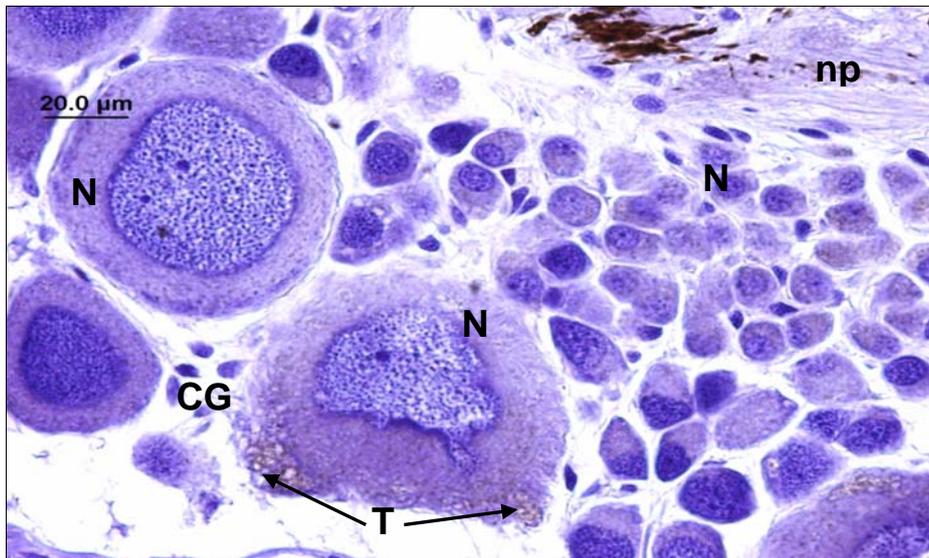
**Figura 4.7.-** M.E. b) 8000X. Características morfológicas de la célula glial. Núcleo con cromatina marginal, escaso citoplasma perinuclear y largas prolongaciones (→). N: neurona. Li: lisosoma. c) 25.000X. Estrecha aposición de las prolongaciones membranosas de las células gliales sobre las invaginaciones de la membrana plasmática (→). REG: retículo endoplasmático granular. Li: lisosoma.

En la Fig. 4.8 la reacción positiva de la conexina 26 se observa en puntos discretos, periféricos en el soma neuronal, que podrían corresponderse con expansiones de glía que penetran en las invaginaciones de la membrana de la neurona, es decir en la tropospongia (T). La positividad se produce en las células de glía (CG), no en las neuronas (N). En el neuropilo (np) se observan finas fibras positivas que se pueden considerar expansiones de las células de glía positivas.

En la Fig. 4.9 se representa la reacción positiva para los canales iónicos de tipo SK2. Se observa la reacción positiva en puntos discretos, periféricos en el soma neuronal, que podrían corresponderse con la tropospongia (T). Se podría interpretar que la reacción positiva, muy tenue, se produce en las células de glía (CG). Obsérvese reacción positiva en el neuropilo (np).

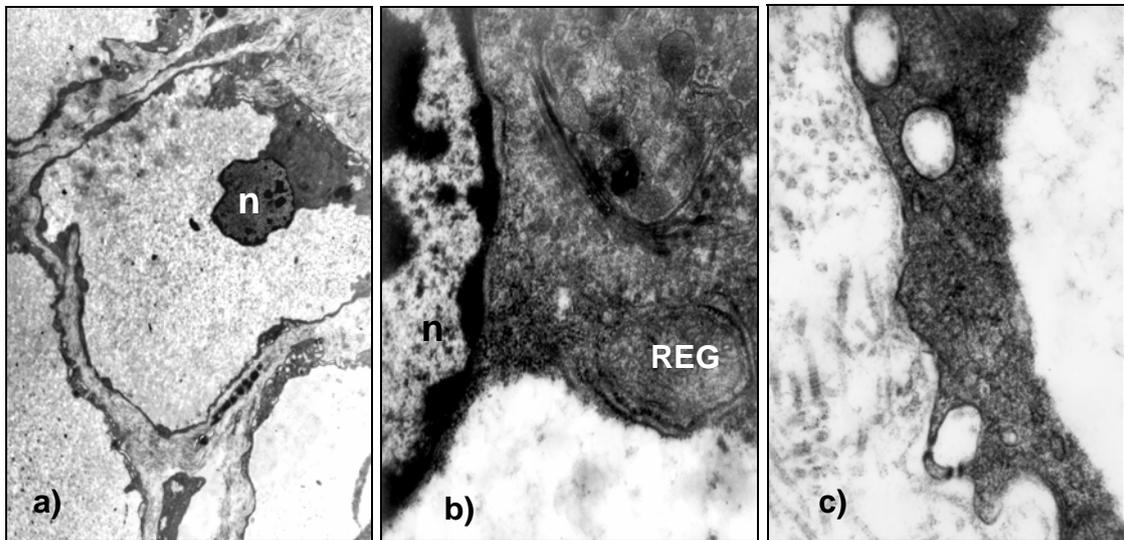


**Figura 4.8-** EnVisión® 40X. Ha 46 (conexina 26). CMA de frecuencia 1.8 GHz, potencia de 520 mW, y SAR de  $1.75 \times 10^{-5}$  W/Kg). N: neurona. np: neuropilo. CG: célula glial. T: trossopongia.



**Figura 4.9.-** EnVisión® 40X. Ha 46 (SK2). CMA de 1mT, frecuencia de 4 Hz y tiempo de aplicación 30 minutos. N: neurona. np: neuropilo. CG: célula glial. T: trossopongia.

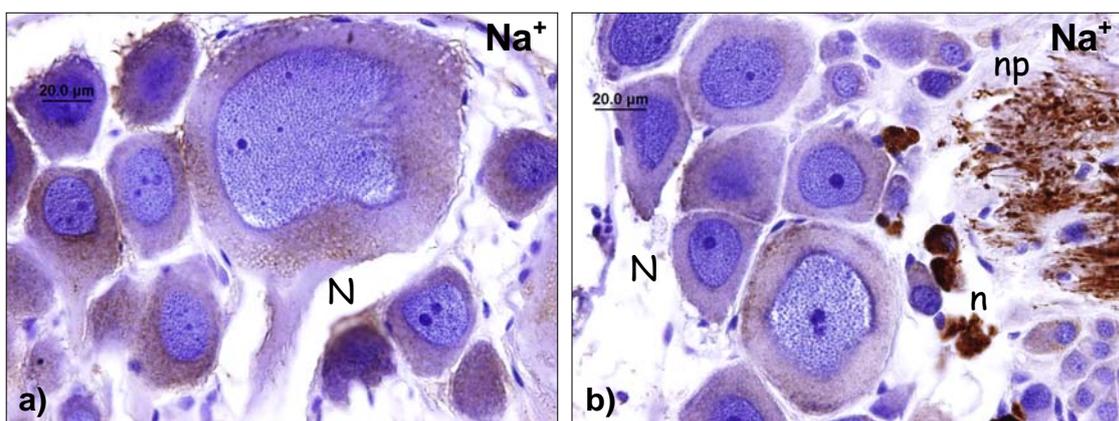
En la periferia de los ganglios, por debajo de la lámina basal, se encuentran las denominadas *células globulares*. Estas células presentan núcleos poligonales muy cromáticos totalmente excéntricos (Fig. 4.10a). De forma característica, en el citoplasma de estas células se aprecia una elevada electrodensidad, abundante retículo endoplasmático granular (REG) (Fig. 4.10b). A través de estas células tiene lugar el transporte de metabolitos, entre la hemolinfa y el tejido nervioso, posiblemente mediado por vesículas endocíticas ó fagocíticas (Fig. 4.10c).



**Figura 4.10.-** M.E. a) 3000X. Célula globular mostrando el núcleo (n) en posición excéntrica. b) 25.000X. Detalle de una célula globular. Nótese la elevada electrodensidad del citoplasma. REG: retículo endoplasmático granular. c) 40.000X. Formación de vesículas endo/fagocíticas en una célula globular.

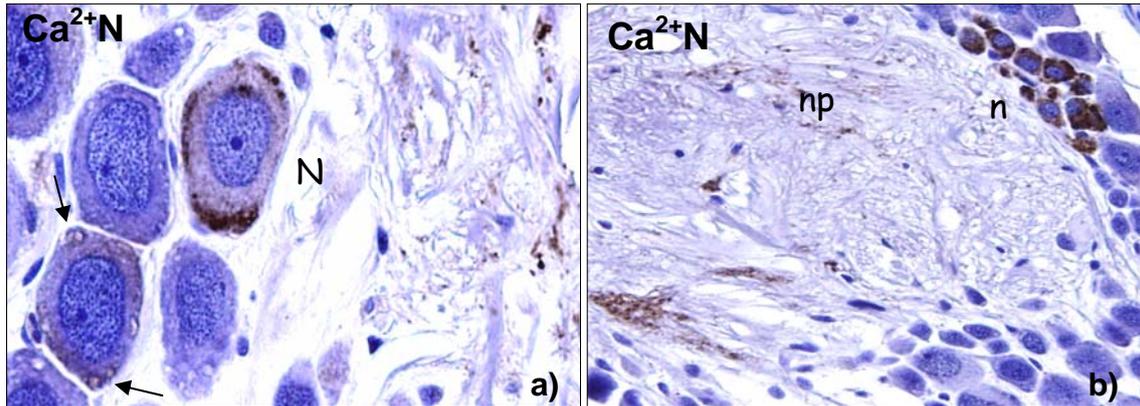
#### 4.3.3.- CARACTERIZACIÓN DE CANALES IÓNICOS POR INMUNOCITOQUIMIA

Los resultados de inmunocitoquimia para los diferentes canales iónicos estudiados los expresamos como el porcentaje de neuronas que han dado reacción positiva frente a un antisuero determinado. La positividad indica que la neurona expresa la proteína específica en estudio. Aproximadamente el 100% de las neuronas son positivas para los canales de  $\text{Na}^+$  operados por voltaje y para los canales de  $\text{K}^+$  operados por voltaje de rectificación retardada. La expresión de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje disminuye a un 4.6% para los canales tipo P/Q y al 9.5% para los canales tipo N. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L se expresan en el 56% de las neuronas. Con respecto a los canales de  $\text{K}^+$  activados por el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular los canales de pequeña conductancia tipo SK2 están representados en el 88% de las neuronas, mientras que los canales de alta conductancia tipo  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  se han observado en el 93.6% de las neuronas. Para cada antisuero se ha observado un tipo de reacción diferente. La reacción para los canales de  $\text{Na}^+$  se observa en el seno del citoplasma de las neuronas (Fig. 4.11a). En la Fig. 4.11b se observa una marcada reacción en el neuropilo (np) y en neuronas de pequeño tamaño (n).



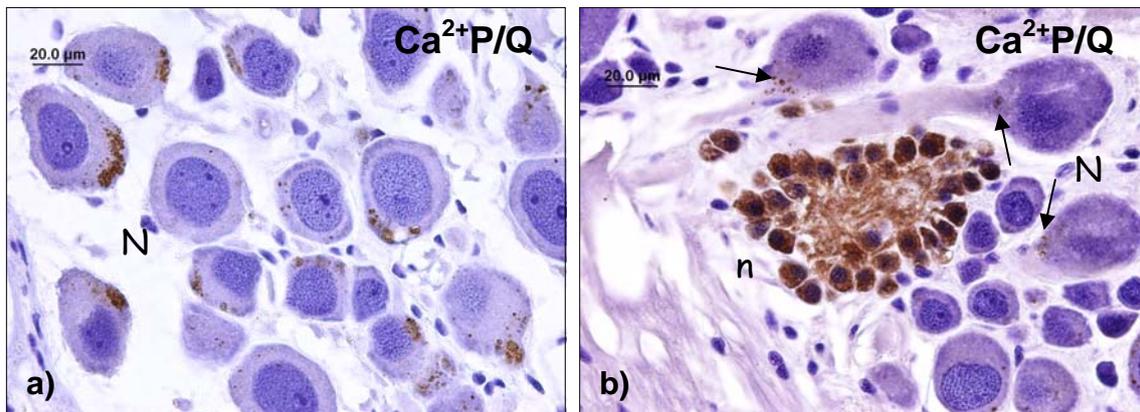
**Figura 4.11.-** EnVisión®. a) 40X. **Ha 40** (2 Hz, 1 mT, 15 min.). Los canales de sodio se expresan en el 100% de las neuronas. La reacción positiva se observa en el seno del citoplasma. b) 20X. **Ha 46** (4 Hz, 1 mT, 30 min.). Se observa alta densidad de reacción positiva en el neuropilo (np).

La positividad para los canales de calcio tipo N se observa en localizaciones precisas de la membrana de las neuronas de gran tamaño (Fig. 4.12a). En la Fig. 4.12b se observa una reacción intensa en neuronas pequeñas (n).



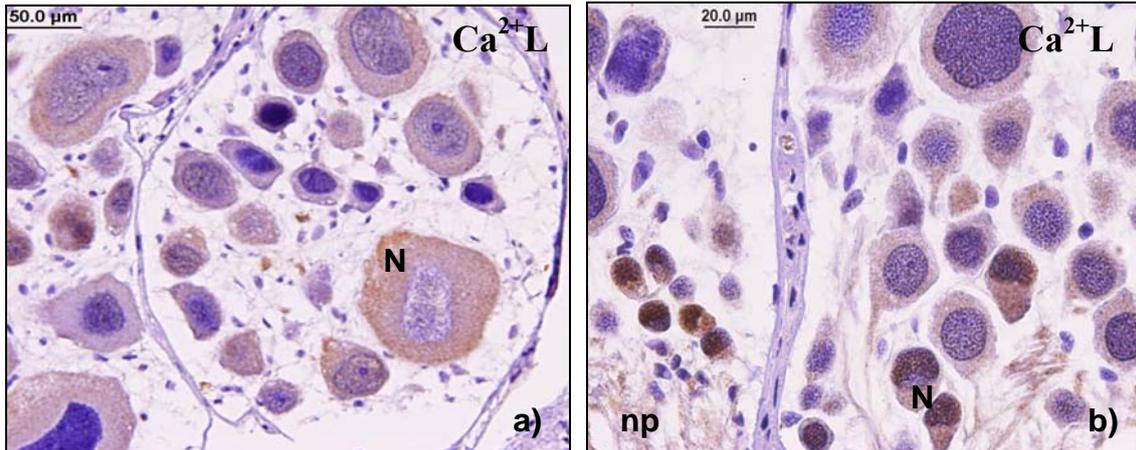
**Figura 4.12.-** EnVisión®. a) 20X. **Ha 46** (4 Hz, 1 mT, 30 min.). Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje tipo N se expresan en el 9.5% de las neuronas. Se observa reacción positiva en neuronas y neuropilo. b) 20X. **Ha 46** (4 Hz, 1 mT, 30 min.). Alta intensidad de reacción en neuronas pequeñas (n).

La disposición de los canales de calcio tipo P/Q se observa asimismo en localizaciones concretas de la membrana (Fig. 4.13a). En la Fig. 4.13b se observa positividad en el cono axónico de neuronas de mayor tamaño y una alta reacción positiva para neuronas pequeñas.



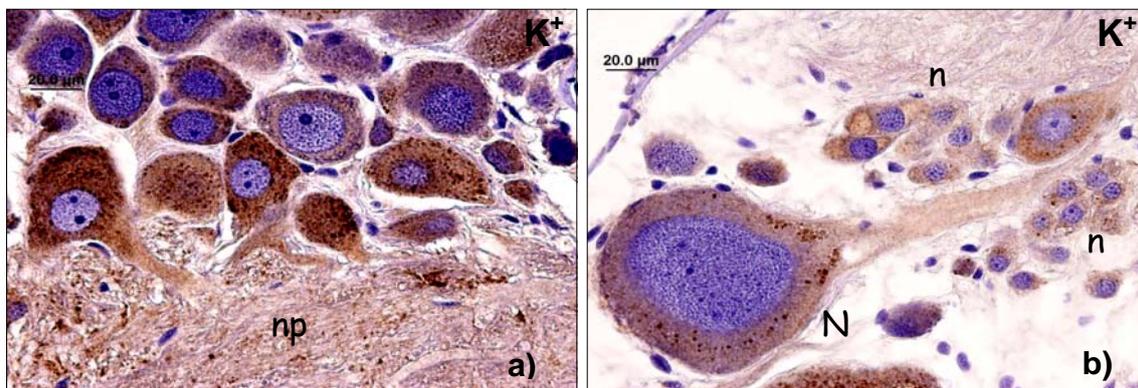
**Figura 4.13.-** EnVisión®. a) 40X. **Ha 28** (217 Hz, 0.01 mT, 15 min.). Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje tipo P/Q. Se expresan en el 4.6% de las neuronas. Se localizan específicamente en neuronas. b) 40x. **Ha 20** (8.3 Hz, 0.1 G, 15 min.). Alta expresión en neuronas de pequeño tamaño (n). Positividad en el cono axónico (→) de las neuronas de mayor tamaño (N).

Los canales de calcio dependiente de voltaje de tipo L se localizan de forma homogénea en el citoplasma de las neuronas (Fig. 4.14a) y de forma intensa y más específica en el núcleo de algunas de ellas (Fig. 4.14b).



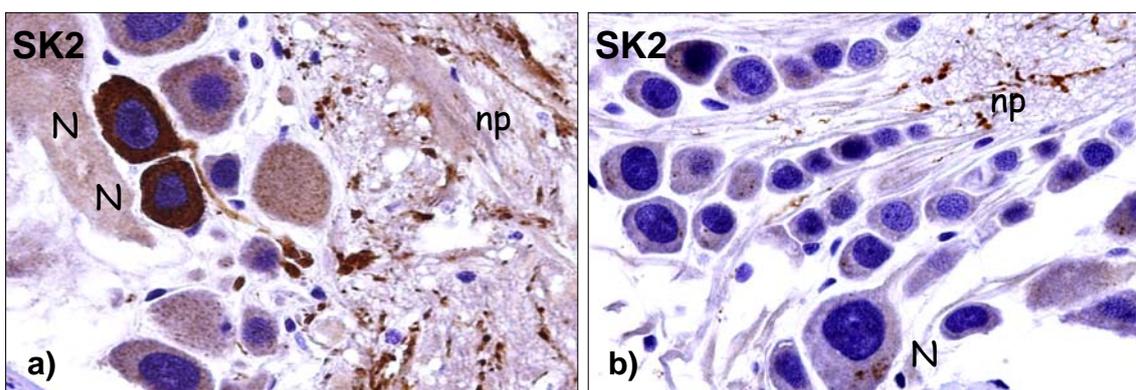
**Figura 4.14.-** EnVisión®. a) 20X. **Ha 94** (50 Hz, 1 mT, 60 min.). Canales de calcio operados por voltaje de tipo L. Se expresan en el 56% de las neuronas. Se observa reacción positiva distribuida en el citoplasma de la neurona (N). b) 40X. **Ha 91** (50 Hz, 1 mT, 15 min.). Se observa positividad en el neuropilo (np) y en el núcleo de las neuronas.

En el caso de los canales de  $K^+$  de rectificación retardada la reacción se observa en el seno del citoplasma y en el neuropilo (Fig. 4.15a). En la Fig. 4.15b se observa positividad en zonas específicas de las neuronas.



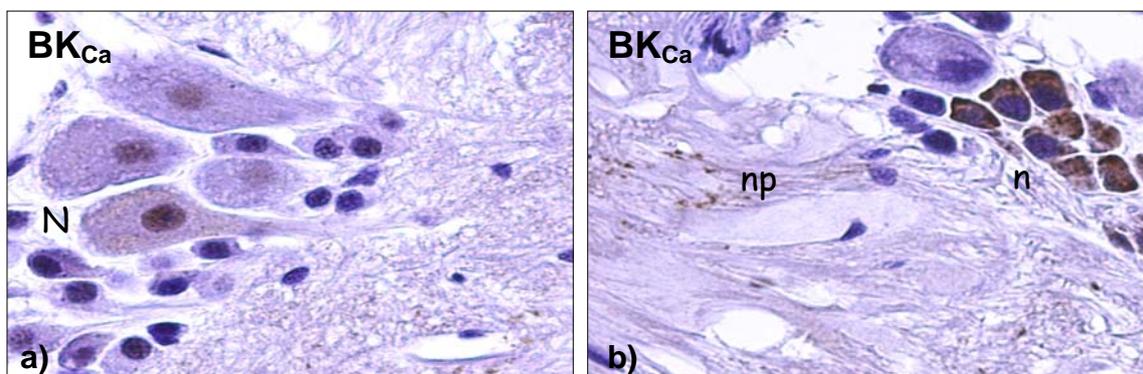
**Figura 4.15.-** EnVisión®. a) 40X. **Ha 46** (4 Hz, 1 mT, 30 min.). Canales de  $K^+$  activados por voltaje de rectificación retardada. Se expresan en el 100% de las neuronas. Se localizan en las neuronas y el neuropilo. b) 40X. **Ha 46** (4 Hz, 1 mT, 30 min.). La positividad se observa en zonas específicas de las neuronas (n, N).

El mismo tipo de reacción se observa para los canales de  $K^+$  tipo SK2, la reacción consiste en un fino punteado que requiere para su observación grandes aumentos (Fig. 16a). En la Fig. 4.16b se muestra positividad en zonas específicas de las neuronas y en el neuropilo.



**Figura 4.16.-** EnVisión®. a) 40X. **Ha 32** (50Hz, 0.01 mT, 60 min.). Canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  intracelular de pequeña conductancia, SK2. Se expresan en el 88% de las neuronas. Se observa una alta densidad en neuronas (N) y neuropilo (np). b) 40X. **Ha 8** (control, 15 min.). Se observa positividad en zonas específicas de las neuronas (N) y el neuropilo (np).

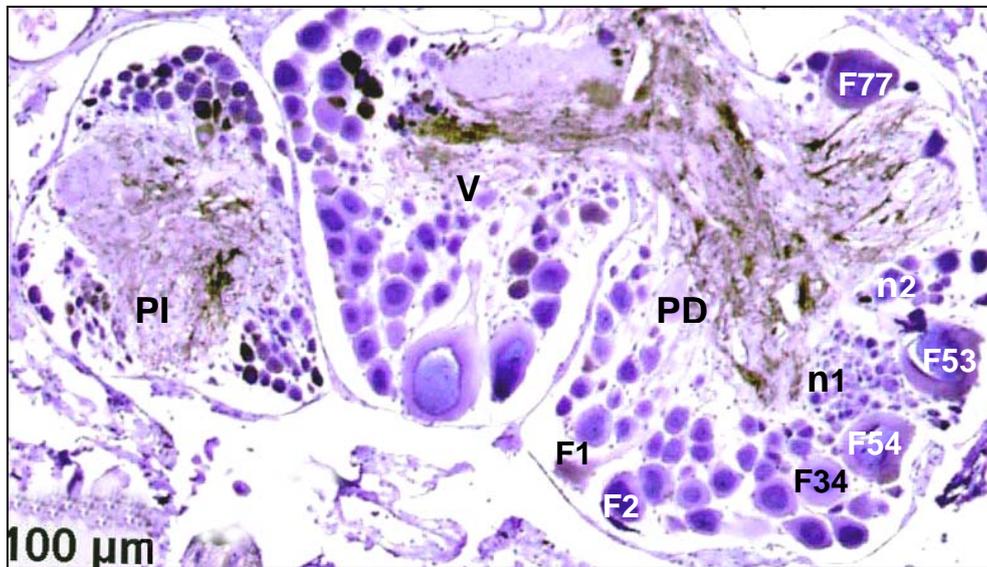
En el caso de los canales de potasio tipo  $BK_{Ca}$  su localización es asimismo difusa en el seno del citoplasma y destaca la positividad observada en el núcleo (Fig. 17a). En la Fig. 4.17b se observa reacción positiva en el neuropilo y una alta expresión en neuronas de pequeño tamaño.



**Figura 4.17.-** EnVisión®. a) 40X. **Ha 20** (8.3 Hz, 0.01 mT, 15 min.). Canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  intracelular de alta conductancia,  $BK_{Ca}$ . Se expresan en el 93.6% de las neuronas. Se observa reacción positiva en el núcleo. b) 40X. **Ha 32** (50 Hz, 0.01 mT, 60 min.). Se observa positividad en el neuropilo (np) y una alta densidad de reacción en neuronas pequeñas (n).

Para todos los antiseros testados las neuronas de tamaño pequeño muestran alta densidad de reacción en el seno del citoplasma (Figs. 4.11b, 4.12b, 4.13b, 4.15b y 4.17b).

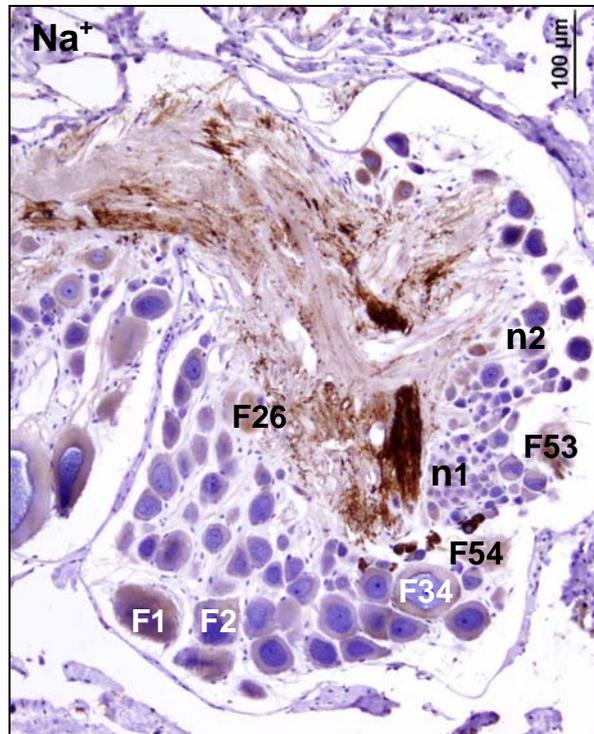
En la Fig. 4.18 se observa una sección panorámica de la zona del tejido en la que se han estudiado los canales iónicos por inmunocitoquímica en cortes seriados. Esta imagen se ha tomado de un trabajo paralelo en el que se ha estudiado la expresión de la conexina 26 en neuronas y células de glía y la utilizamos para reconocer las estructuras y localización específica de las neuronas en el estudio de localización de canales realizado en cortes seriados de tejido.



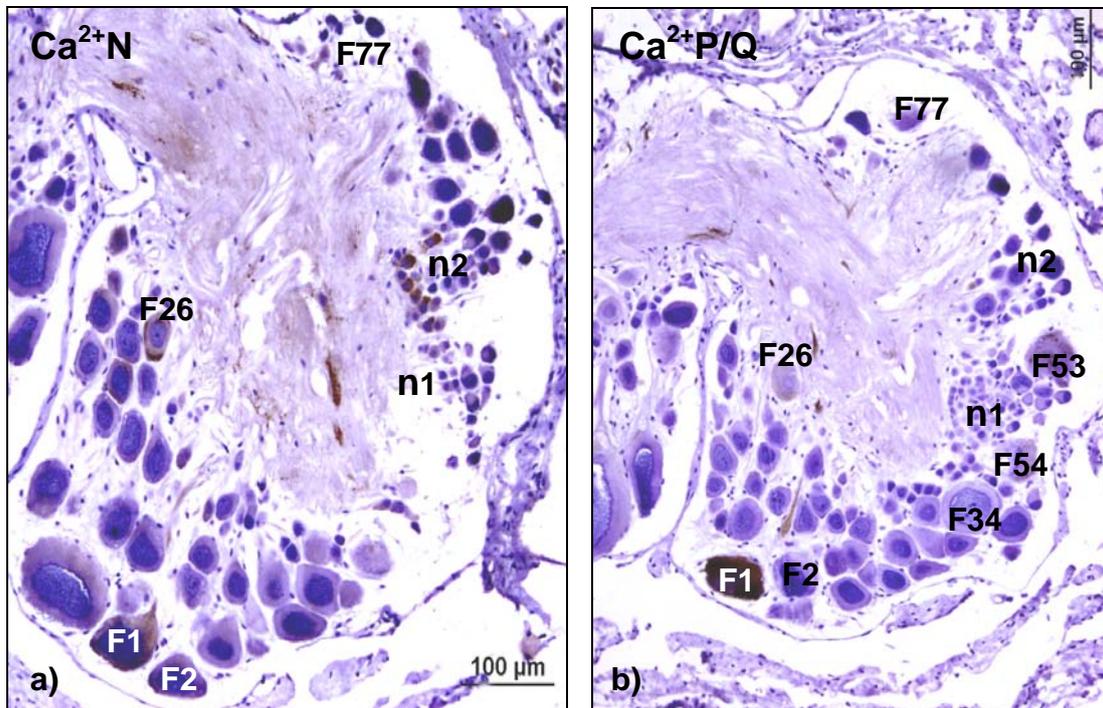
**Figura 4.18.-** EnVisión® 4X. Reacción de inmunocitoquímica para caracterizar la expresión de la conexina 26. V: ganglio visceral. PI: parietal izquierdo. PD: parietal derecho. Las neuronas se reconocen por la numeración.

Hemos centrado la atención en un grupo de neuronas del ganglio parietal derecho. En el caso de la neurona F1 se puede ver que expresan todos los tipos de canales estudiados (Figs. 4.19 - 4.23). En el caso de otras neuronas la expresión de canales es diferencial. En las neuronas F2 y F34 se expresan los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+L}$ . En las neuronas F53 y F54 se expresan los canales  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+L}$ , SK2 y  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . En la neurona F26 se expresan los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+N}$  y  $\text{Ca}^{2+L}$ . En la neurona F77 se expresan los canales de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+L}$  y  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . En las neuronas n1 se expresan los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y en las neuronas n2 se expresan los canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+N}$  (Figs. 4.19 - 4.23). Se

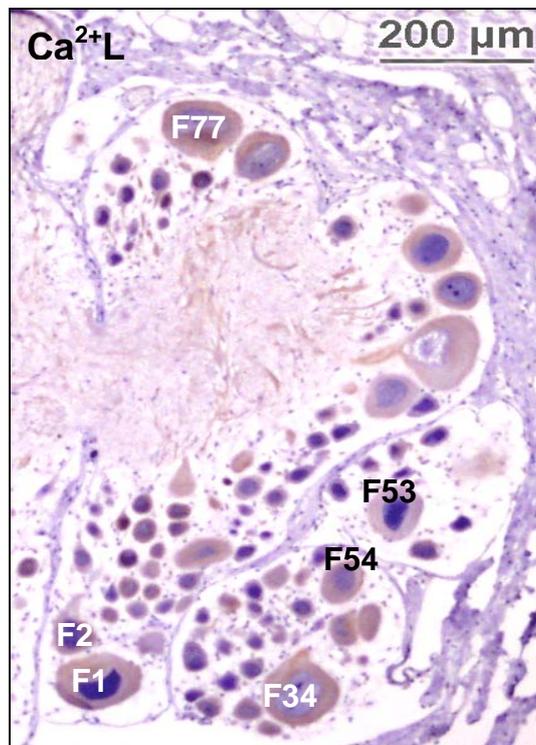
observa que esta técnica nos ha permitido definir para una neurona determinada los tipos de canales que expresa, y su localización topográfica en la morfología neuronal. La caracterización de la densidad relativa requiere otro tipo de metodología. Consideramos que estos tres parámetros junto con las propiedades intrínsecas de activación - desactivación de los canales iónicos podrían explicar la frecuencia característica de cada tipo de neurona y los cambios inducidos en la misma, sometida a condiciones experimentales controladas.



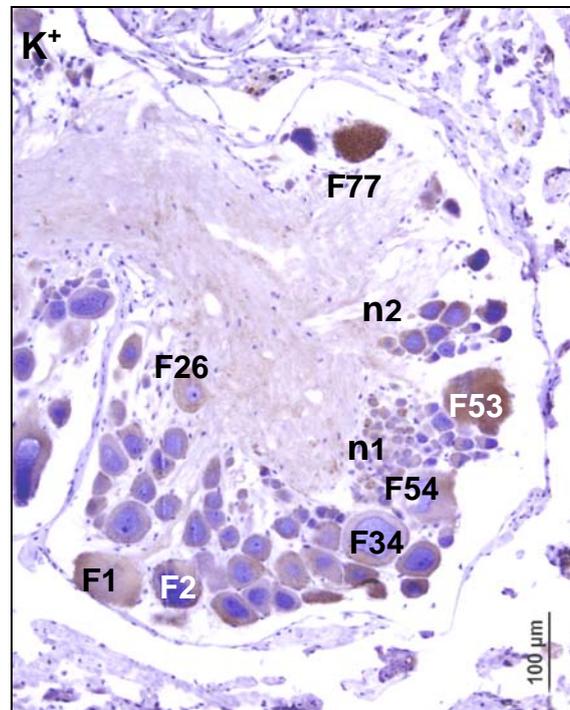
**Figura 4.19-** EnVisión® 10X. Canales de Na<sup>+</sup> operados por voltaje.



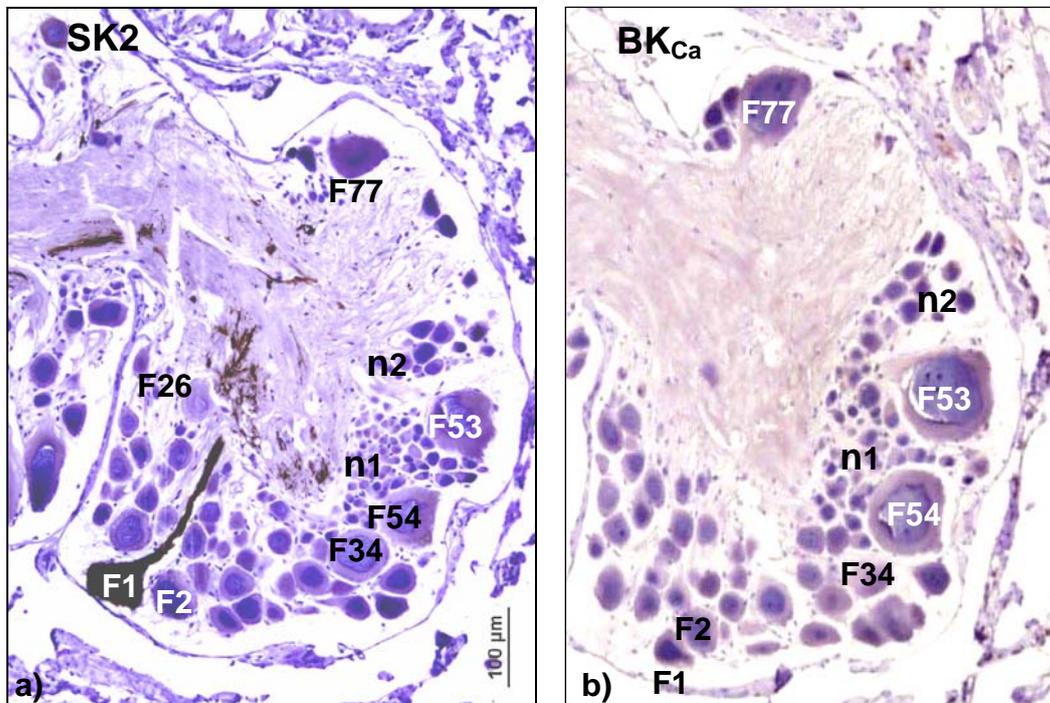
**Figura 4.20.-** EnVisión® 10X. a) Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje tipo N. b) Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje tipo P/Q.



**Figura 4.21.-** EnVisión® 4X. Canales de calcio operados por voltaje de tipo L.



**Figura 4.22.-** EnVisión® 10X. Canales de  $K^+$  operados por voltaje de rectificación retardada.



**Figura 4.23.-** EnVisión® 10X. a) Canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  intracelular de pequeña conductancia (SK2). b) Canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  intracelular de alta conductancia ( $BK_{Ca}$ ).

#### **4.4.- ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL CON EL CAMPO MAGNÉTICO APLICADO**

Del total de las neuronas estudiadas, el 82% son magnetosensibles, de las que un 50% presenta respuestas de inhibición y un 20% de estimulación. Respuestas más complejas se registran en un 12% de las neuronas magnetosensibles, en las que se observan conjuntamente efectos bifásicos de estimulación e inhibición. El 18% de las neuronas estudiadas no responden al campo magnético aplicado, al menos en el tiempo de duración habitual de nuestros experimentos.

Los potenciales estáticos en el tiempo no generan transmisión de información en el Sistema Nervioso (SN). Es necesario que estas diferencias de potencial cambien en el espacio y tiempo, de forma que puedan transmitirse a lo largo de toda la membrana neuronal. Estos cambios de potencial espacio - temporales se denominan potenciales de acción y son las verdaderas unidades de transmisión de la información del SN.

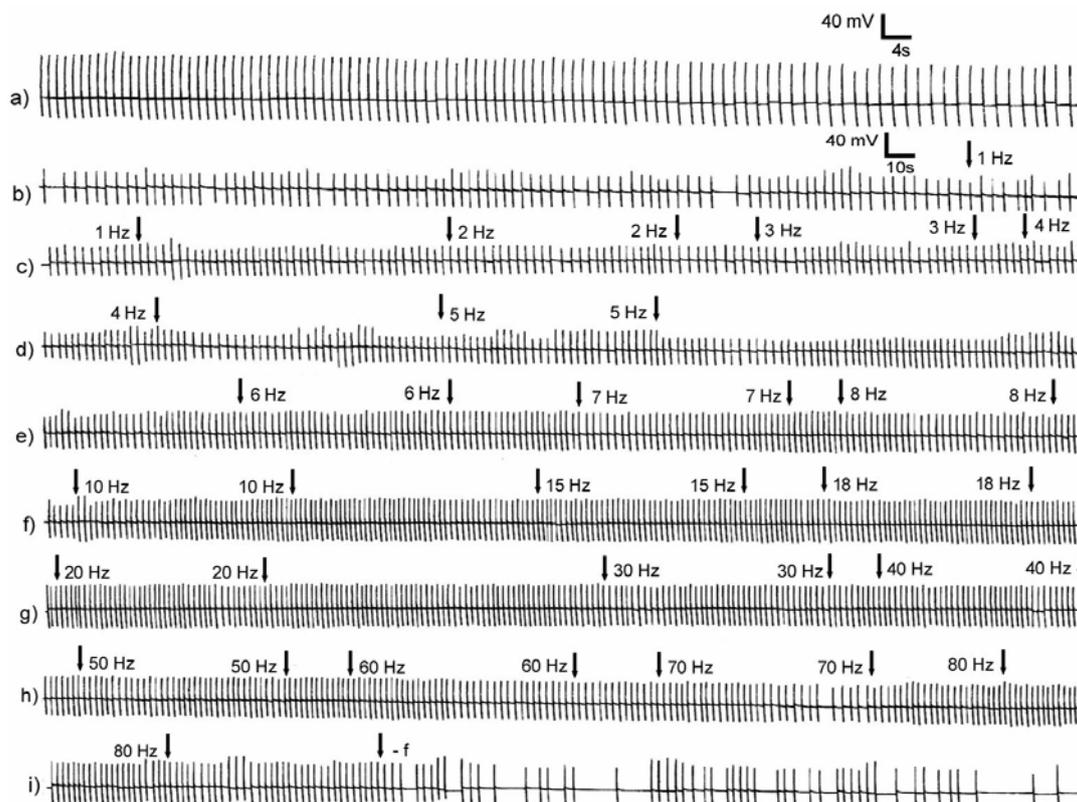
La actividad bioeléctrica de una neurona bajo exposición a un campo magnético en el rango de frecuencias extremadamente bajas y de baja intensidad se puede registrar como una disminución o aumento en la frecuencia de los potenciales bioeléctricos y en algunos casos, además, por modificaciones en la amplitud y morfología de los mismos.

Los experimentos realizados se han organizado por bloques asignando a cada uno condiciones experimentales diferentes. Se han llevado a cabo exposiciones para un rango de frecuencias del campo magnético de 0.1 a 217 Hz, intensidades entre 0.2  $\mu$ T y 2 mT y tiempos de exposición de 1, 3 y 10 minutos. En todos los experimentos la forma de onda usada fue la sinusoidal.

#### **4.4.1.- BLOQUE 1. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CMA DE INTENSIDAD CONSTANTE Y FRECUENCIA VARIABLE EN EL RANGO DEL EEG HUMANO**

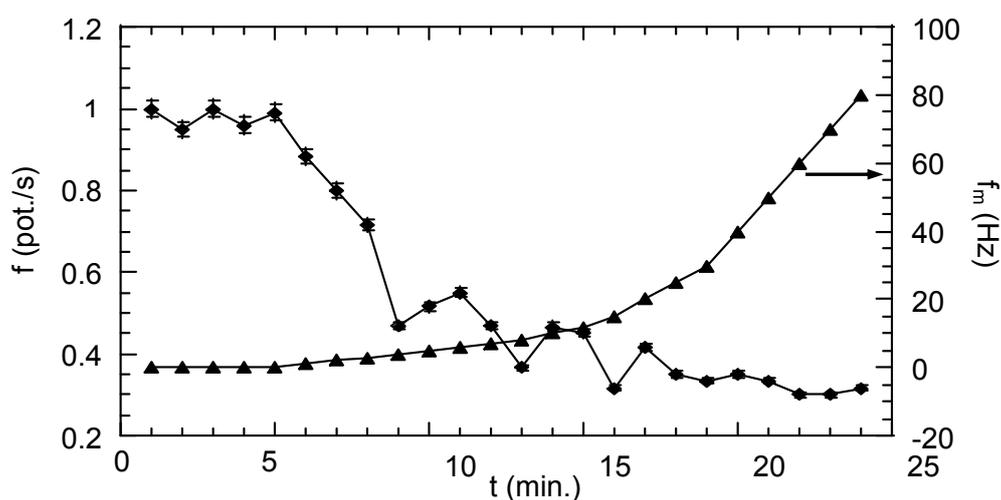
El primer bloque de experimentos se realizó con la finalidad de estudiar las respuestas de las neuronas a un CMA de intensidad constante, de 1 mT, y frecuencia variable en el rango que ha sido definido como típico de la actividad rítmica de la corteza en humanos (0.1 a 80 Hz). En este intervalo se destacan las ondas Delta ( $\delta$ , 1 - 4 Hz), Theta ( $\theta$ , 5 - 7 Hz), Fusiformes (7 - 14 Hz), Alfa ( $\alpha$ , 8 - 12 Hz), Mu ( $\mu$ , 12 - 18), Beta ( $\beta$ , 15 - 30) y Gamma ( $\gamma$ , 30 - 80 Hz). El tiempo de exposición fue de 1 minuto.

En las neuronas estudiadas, los resultados muestran una amplia variedad de respuestas en frecuencia. En la Fig. 4.24 se muestra la modificación de la actividad bioeléctrica de la neurona V4, del ganglio visceral bajo exposición a CMA de frecuencia en el rango de 1 a 80 Hz. La neurona responde de forma inmediata al CMA aplicado con un aumento en la frecuencia de disparo. La frecuencia de los potenciales continúa aumentando a medida que se incrementa la frecuencia del CMA alcanzando un valor máximo de 0.7 pot./s en el rango de 10 a 40 Hz. Para valores de frecuencia del CMA de 50, 60 y 70 Hz se observa un ligero descenso de la frecuencia y con exposición a 80 Hz una recuperación. Finalmente, al disminuir la frecuencia del CMA la frecuencia de la neurona disminuye bruscamente.



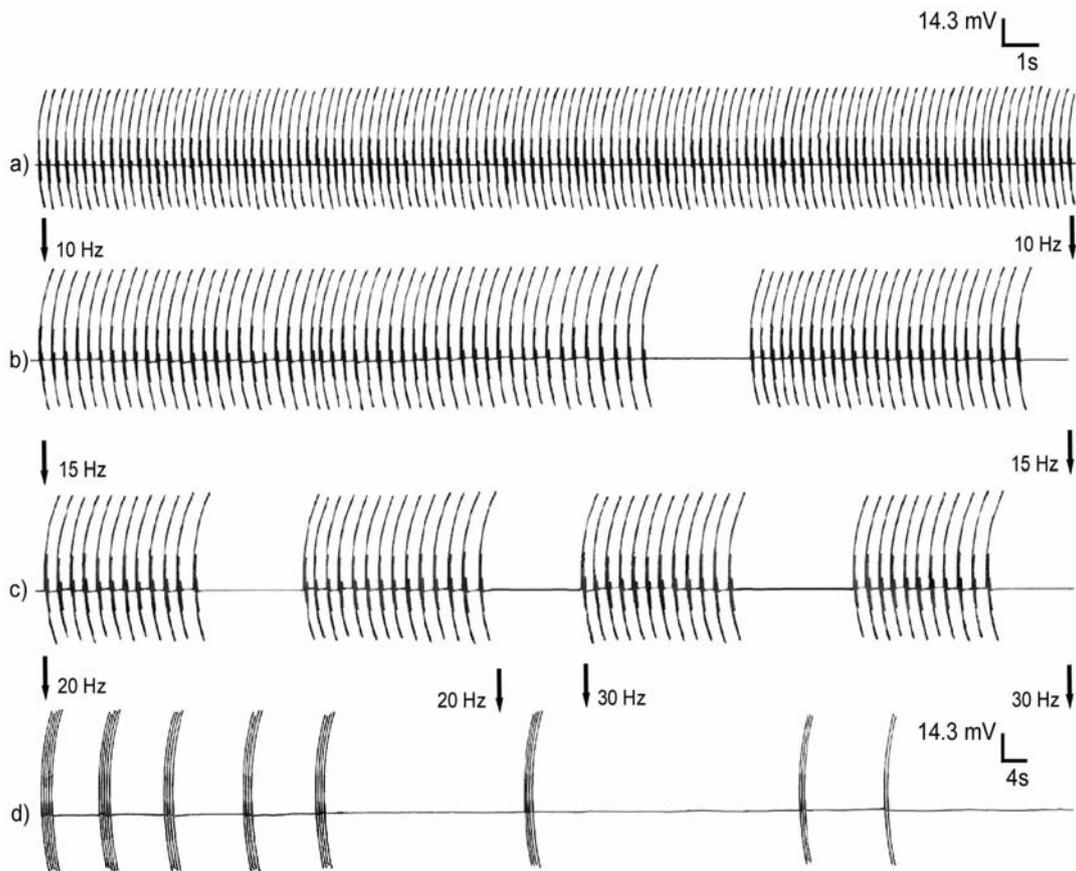
**Figura 4.24.-** Neurona V4, CMA de 1mT y frecuencia variable en el rango de 0.1 a 80 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 1 minuto. Registro a) actividad espontánea,  $f_0 \approx 0.5$  pot./s. Registros (b - g) la frecuencia de los potenciales aumenta continuamente con el incremento de la frecuencia del CMA. Registro h) la frecuencia de los potenciales experimenta una ligera disminución para valores de frecuencia del campo de 50 a 70 Hz. Registro i) la frecuencia de la neurona disminuye bruscamente al disminuir la frecuencia del campo aplicado. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 42 minutos.

En la Fig. 4.25 se muestra la evolución de la actividad bioeléctrica de la neurona V9 del ganglio visceral mediante una representación gráfica. Se representa la modificación de la frecuencia de los potenciales bioeléctricos en función de la frecuencia del CMA en el tiempo de desarrollo del experimento. Puede observarse la respuesta inmediata de la neurona al CMA aplicado con disminución de su frecuencia de disparo, a partir del momento en que comienza la aplicación del CMA. La frecuencia de la actividad bioeléctrica disminuye de forma continuada con el incremento de la frecuencia del campo aplicado. A los 24 minutos, bajo exposición a CMA de 80 Hz, la neurona queda prácticamente inhibida.



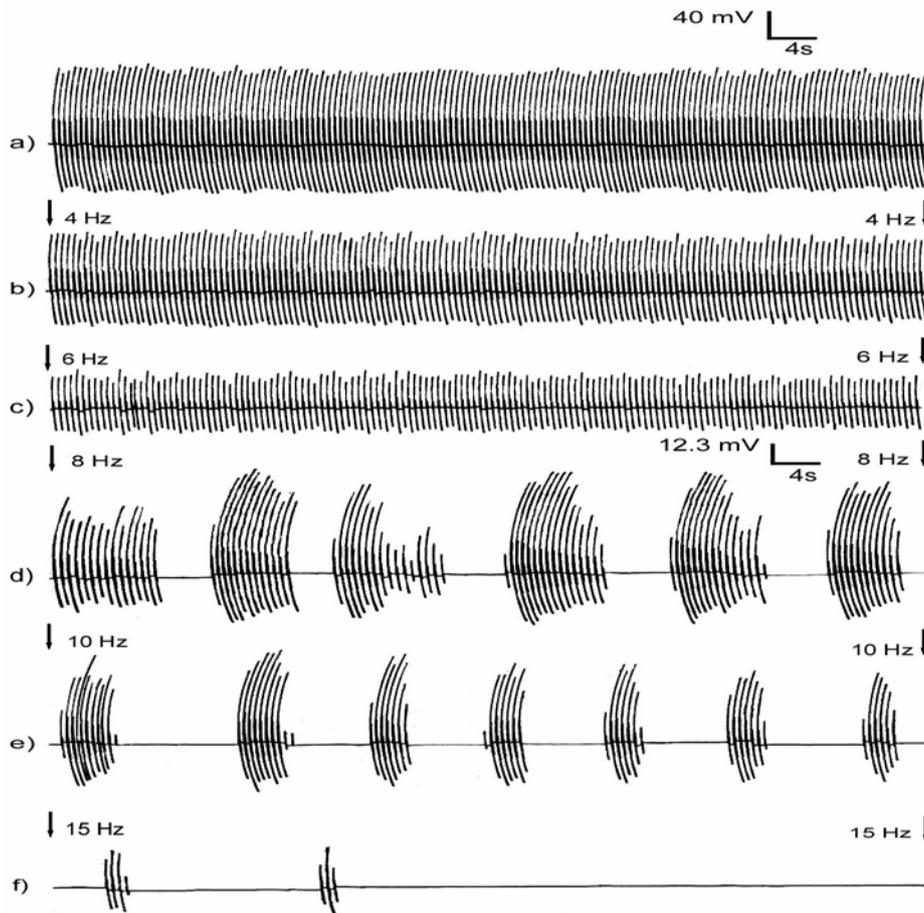
**Figura 4.25.-** Neurona V9. Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , (♦) expresada en (pot./s), en función de la frecuencia del campo magnético aplicado,  $f_m$ , (▲) expresada en Hz y en el tiempo de duración del experimento. La actividad espontánea es  $f_0 \approx 1.1$  pot./s. La neurona se expuso a un campo magnético de 1mT de frecuencia variable en el rango de 0.1 a 80 Hz. Cada valor de  $f_m$  se aplicó durante 1min. Se observa la disminución de la frecuencia de disparo, a partir del momento en que se inicia la aplicación del CMA. A los 25 minutos la neurona queda prácticamente inhibida. La duración del experimento fue de 24 minutos.

En la Fig. 4.26 se muestra la actividad de la neurona D1, observándose una respuesta de reclutamiento bajo CMA de 10 Hz. El reclutamiento se caracteriza por un cambio de ritmo en la frecuencia de los potenciales. La actividad bioeléctrica continuada se hace discontinua en ráfagas de un cierto número de potenciales que va disminuyendo con el incremento de la frecuencia del CMA. Para 10, 15, 20 y 30 Hz el número de potenciales en cada ráfaga es de 25, 14, 4 y 2 respectivamente. Los potenciales de acción de las ráfagas mantienen la misma amplitud.



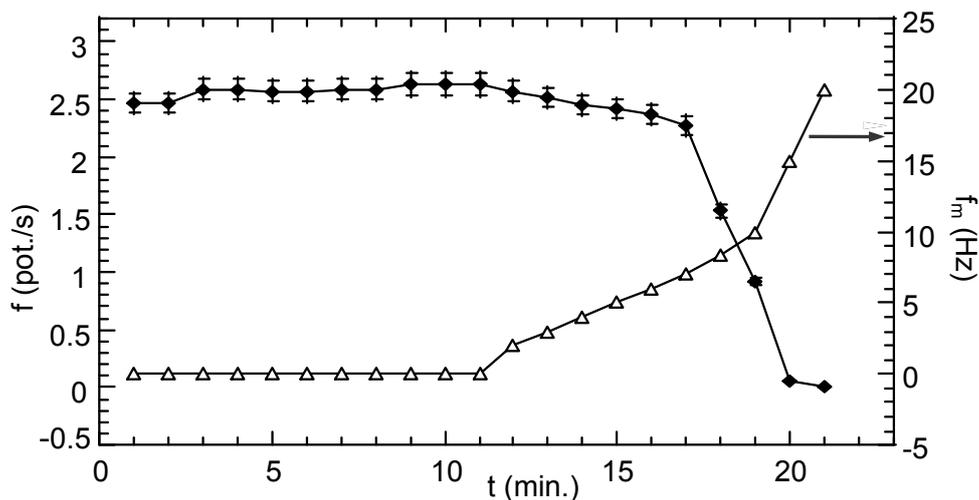
**Figura 4.26.-** Neurona D1, CMA de 1mT y frecuencia variable en el rango de 10 a 30 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 1 minuto. Registro a) actividad espontánea,  $f_0 \approx 3.8$  pot./s. Registros b) y c) la amplitud de los potenciales aumenta ( $\approx 10\%$ ), se induce actividad de reclutamiento para valores de frecuencia del CMA de 10 y 15 Hz. Registro d) continúa la actividad de reclutamiento con disminución de la frecuencia de los potenciales, para valores de frecuencia del campo de 20 y 30 Hz. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 3.5 minutos.

En la Fig. 4.27 se muestra la actividad de la neurona F1 del ganglio parietal derecho. Para valores de frecuencia del CMA de 8, 10 y 15 Hz se induce actividad de reclutamiento, la amplitud de los potenciales decrece continuamente, a partir del CMA de 4 Hz, hasta que la actividad de la neurona queda completamente inhibida para el CMA de 15 Hz. La actividad de reclutamiento se caracteriza por ráfagas de potenciales de número variable. Se observa variación de la amplitud de los potenciales: los de gran amplitud quedan delimitados entre potenciales iniciales y finales de baja amplitud. En las Figuras 4.26 y 4.27 se observan cambios bruscos en la actividad de las neuronas para valores determinados de frecuencia del campo magnético aplicado.



**Figura 4.27.-** Neurona F1, CMA de 1mT y frecuencia variable en el rango de 4 a 15 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 1 minuto. Registro a) actividad espontánea,  $f_0 \approx 2.5$  pot./s. Registros (b - f) la frecuencia y amplitud de los potenciales disminuyen continuamente hasta que la actividad de la neurona queda completamente inhibida. Registros d), e) y f) se induce actividad de reclutamiento para valores de frecuencia del CMA de 8, 10 y 15 Hz. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 6 minutos.

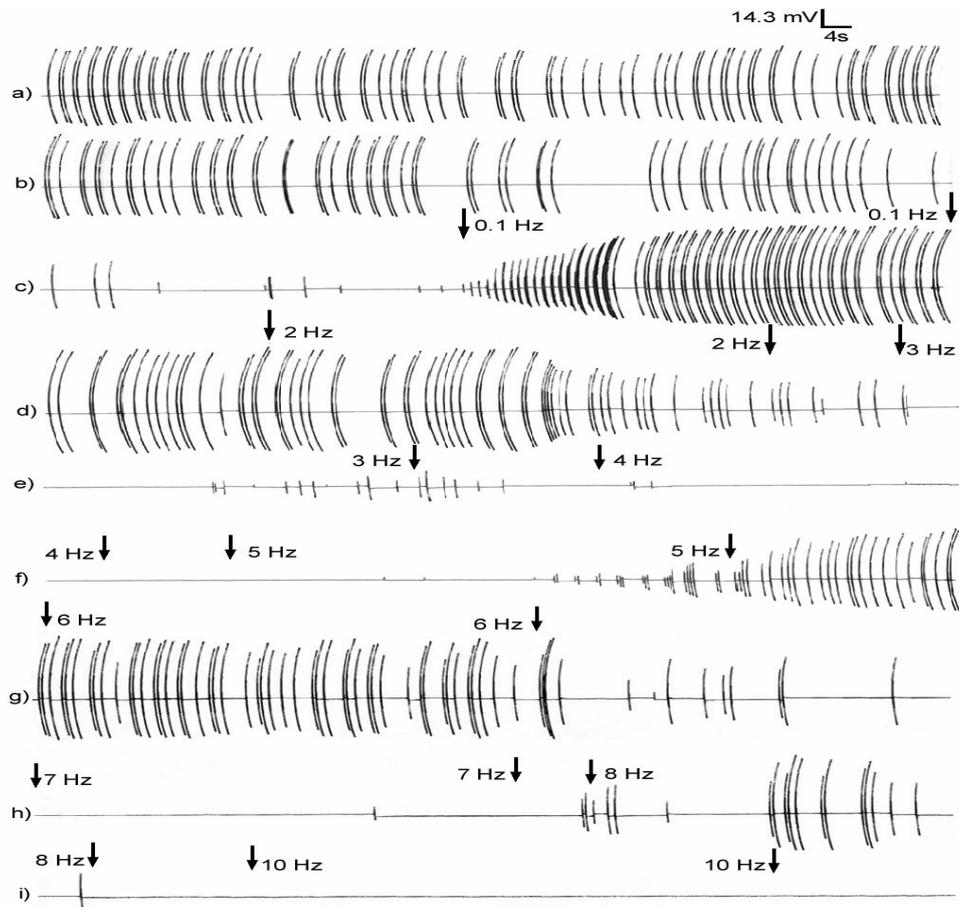
En la Fig. 4.28 se muestra la evolución de la actividad bioeléctrica de la neurona F1 del ganglio visceral mediante una representación gráfica. Se representa la modificación de la frecuencia de los potenciales bioeléctricos en función de la frecuencia del CMA en el tiempo de desarrollo del experimento. Puede observarse la respuesta inmediata de la neurona al CMA aplicado con disminución de su frecuencia de disparo, a partir del momento en que comienza la aplicación del CMA. La frecuencia de la actividad bioeléctrica disminuye de forma continuada con el incremento de la frecuencia del campo aplicado. La respuesta máxima se observa para valores de frecuencia del CMA por encima de los 7 Hz. A los 21 minutos la neurona queda prácticamente inhibida.



**Figura 4.28.-** Neurona F1. Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , (♦) expresada en (pot./s), en función de la frecuencia del campo magnético aplicado,  $f_m$ , (Δ) expresada en Hz y en el tiempo de duración del experimento. La actividad espontánea es  $f_0 \approx 2.5$  pot./s. Se aplica un campo magnético de 1mT de frecuencia variable en el rango de 0.1 a 20 Hz. Cada valor de  $f_m$  se aplicó durante 1min. Se observa que la neurona responde de forma inmediata al CM aplicado con una disminución en la frecuencia de disparo de los potenciales. La respuesta máxima se observa para valores de  $f_m$  a partir de 7 Hz. A los 21 minutos y para  $f_m$  igual a 20 Hz la actividad de la neurona queda prácticamente inhibida. La duración del experimento fue de 21 minutos.

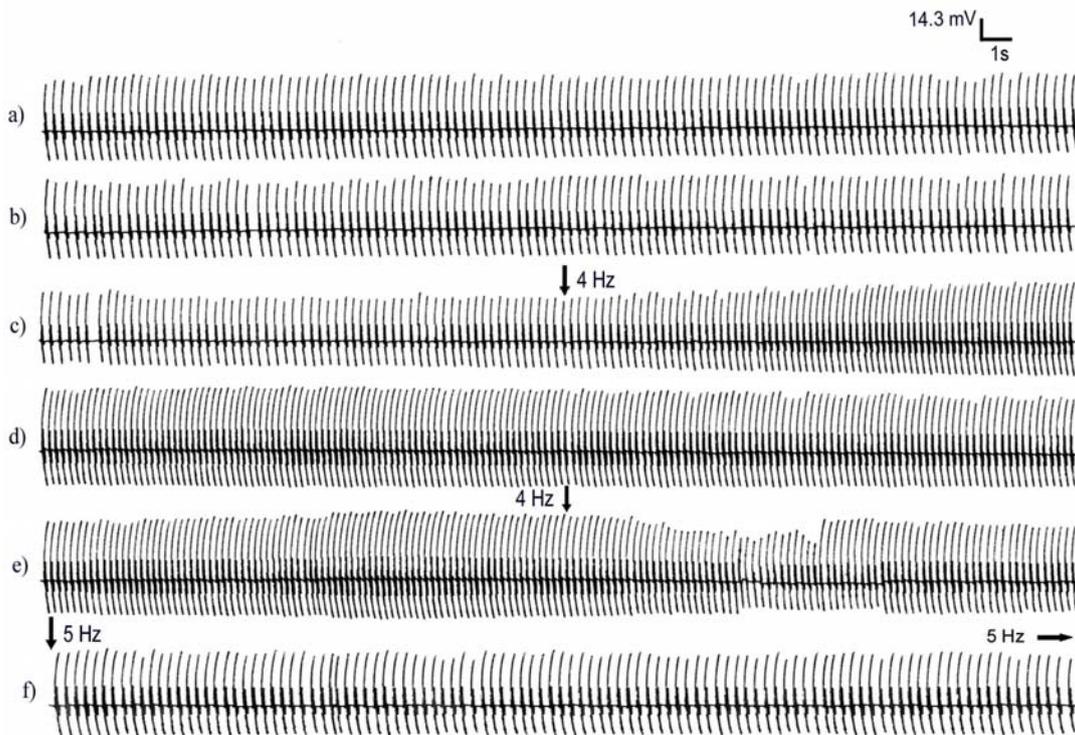
En la Fig. 4.29 se muestra la actividad de la neurona V3, del ganglio visceral. La neurona responde de forma inmediata al campo magnético con un aumento progresivo y brusco de la frecuencia y amplitud de los potenciales que recuerdan un proceso de reclutamiento (Fig. 4.27). La actividad registrada es irregular pues se suceden

intervalos de estimulación e inhibición a lo largo de todo el experimento. Merece la pena destacar que se suceden secuencias de inhibición - activación con un patrón común. La inactivación se produce por una disminución progresiva de amplitud y frecuencia de los potenciales, registros b - c, d y g. La activación se manifiesta con un aumento progresivo de la amplitud y frecuencia de los potenciales, registros c y g.



**Figura 4.29.-** Neurona V3, CMA de 1mT y frecuencia variable en el rango de 0.1 a 10 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 1 minuto. Registros (a - b) actividad espontánea,  $f_0 \approx 0.8$  pot./s. Registro c) la neurona se encuentra prácticamente inhibida y responde de forma inmediata al campo magnético con un aumento progresivo de la frecuencia y amplitud de los potenciales. Registros (d - e), disminución de frecuencia y amplitud bajo exposición a CMA de 2 y 3 Hz. Queda completamente inhibida para 4 Hz. Registro f) la neurona se encuentra inhibida y responde al campo magnético de 5 y 6 Hz con un aumento en la frecuencia y amplitud de los potenciales. En los registros (g - h), bajo CMA de 7 y 8 Hz se observa tendencia a repetir el ciclo inactivación - activación. Registro i) la neurona es completamente inhibida para 10 Hz. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 18 minutos.

En la Figura 4.30 se muestra la actividad de la neurona D4, del ganglio parietal izquierdo. La neurona responde a una frecuencia del CMA de 4 Hz, coincidente con su frecuencia espontánea, aumentando la frecuencia y amplitud de los potenciales. El aspecto global del registro, aunque menos pronunciado, es semejante al observado en el experimento de la Fig. 4.29 para 0.1 y 5 Hz. En ambos experimentos estos efectos se observan para valores de frecuencias de campo que son comparables con las frecuencias típicas de la actividad espontánea de las neuronas. Para una frecuencia del CMA de 5 Hz la amplitud de los potenciales recupera su valor inicial de 22.8 mV y la frecuencia de los potenciales disminuye.



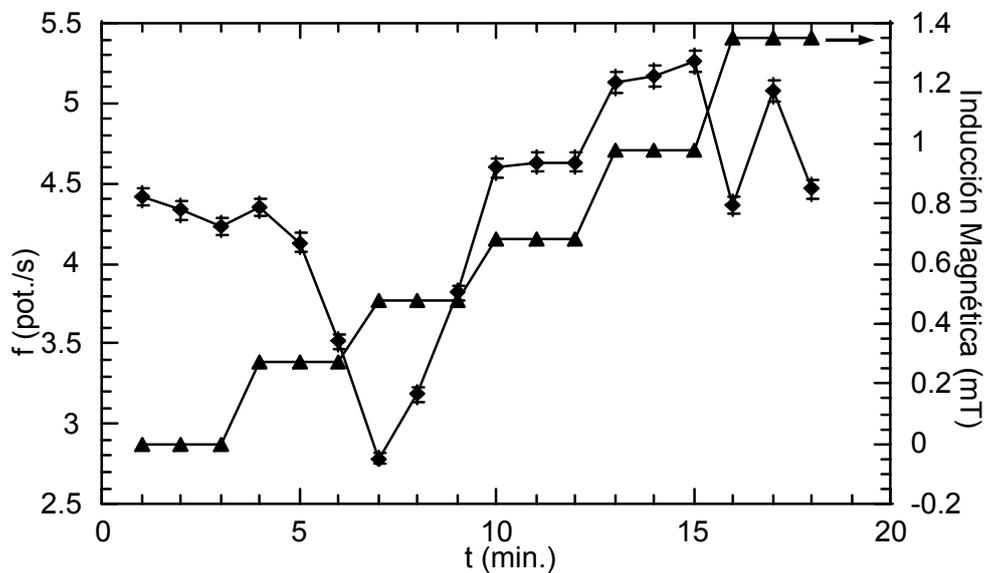
**Figura 4.30.-** Neurona D4, CMA de 1 mT y frecuencia variable en el rango de 4 a 5 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 1 minuto. Registros (a - b) actividad espontánea,  $f_0 \approx 4$  pot./s. Registro c) bajo exposición a un CMA de frecuencia 4 Hz la amplitud de los potenciales bioeléctricos se incrementa aproximadamente en un 30% y la frecuencia alcanza el valor de 5.6 pot./s. Registro f) bajo exposición a un CMA de frecuencia 5 Hz la amplitud de los potenciales recupera su valor inicial de 45.8 mV y la frecuencia disminuye a 4.6 pot./s. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 3 minutos.

Estos experimentos ponen de manifiesto la elevada sensibilidad de las neuronas que responden inmediatamente al CMA de baja frecuencia e intensidad aplicado. Es de destacar la existencia de frecuencias del CMA para las cuales la respuesta neuronal es máxima, y el hecho de que cuando la frecuencia del CMA aplicado es comparable con la frecuencia típica de la actividad espontánea de las neuronas se inducen efectos notables.

#### **4.4.2.- BLOQUE 2. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CMA DE INTENSIDAD VARIABLE Y FRECUENCIA CONSTANTE E IGUAL A LA DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA NEURONA**

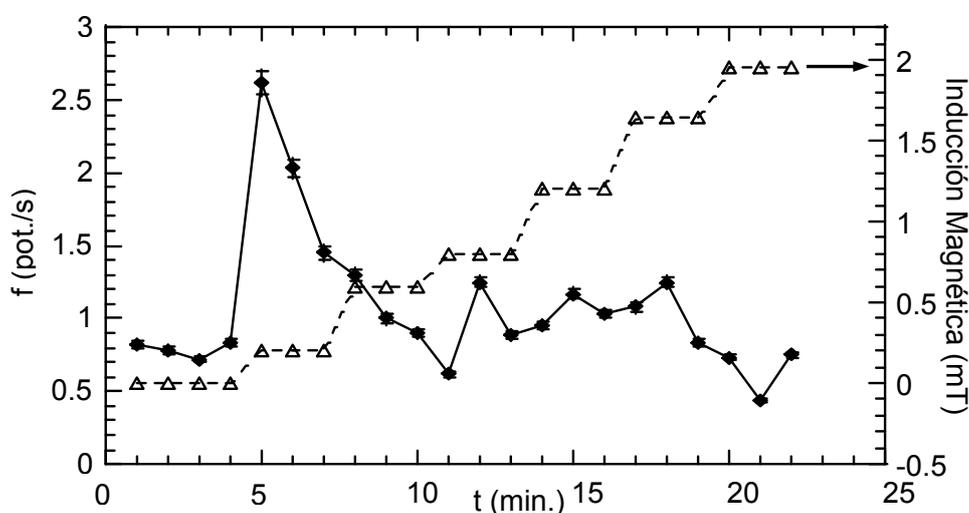
Partiendo de los resultados mostrados se diseñó un segundo bloque de experimentos en los cuales la frecuencia del campo magnético a aplicar, quedó definida en función de la frecuencia típica de la actividad espontánea de las neuronas que se encuentra comprendida entre 0.1 y 5 Hz. La intensidad se varió entre 0.2 y 2 mT y el tiempo de exposición utilizado fue de 3 min. La frecuencia del CMA se mantuvo fija y se modificó la intensidad con el fin de determinar los patrones de respuesta y la sensibilidad de las neuronas bajo estas condiciones.

En la Fig. 4.31 se muestra mediante una representación gráfica la actividad de la neurona D3, del ganglio parietal izquierdo. Se representa la modificación de la frecuencia de los potenciales bioeléctricos en función de la inducción magnética aplicada en el tiempo de desarrollo del experimento. Se observa que la neurona responde de forma inmediata a un campo magnético de 4 Hz y 0.27 mT. La respuesta es bifásica con una disminución de la frecuencia de disparo, seguida de un aumento de la misma para 0.48 mT. Para valores de 1.37 mT la neurona recupera el valor de su frecuencia característica. Se observa reversibilidad del efecto inducido.



**Figura 4.31.-** Neurona D3. Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , ( $\blacktriangledown$ ) expresada en (pot./s), en función de la inducción magnética aplicada,  $B$ , ( $\blacktriangle$ ) expresada en mT y en el tiempo de duración del experimento. La actividad espontánea es  $f_0 \approx 4.2$  pot./s. Se aplica un campo magnético de frecuencia 4 Hz e intensidad en el rango de 0.2 a 1.35 mT. Cada valor de  $B$  se aplicó durante 3 min. Se observa que la neurona responde de forma inmediata a un campo magnético de 0.27 mT con una disminución en la frecuencia de disparo, seguida de un aumento de la misma para 0.48 mT. Con CMA de 1.37 mT la neurona recupera el valor de su frecuencia característica. La duración del experimento fue de 18 minutos.

En la Fig. 4.32 se muestra la actividad de la neurona V3, del ganglio visceral. Se observa el súbito incremento de la frecuencia de disparo hasta 2.6 pot./s cuando se inicia la aplicación del CMA. La respuesta es bifásica, a continuación se produce una disminución de frecuencia que alcanza 0.6 pot./s bajo CMA de 0.8 mT. Aunque **B** se aumenta a 1.2 y 1.64 mT la neurona recupera la frecuencia inicial (reversibilidad del efecto inducido) y para 1.95 mT queda prácticamente inhibida.

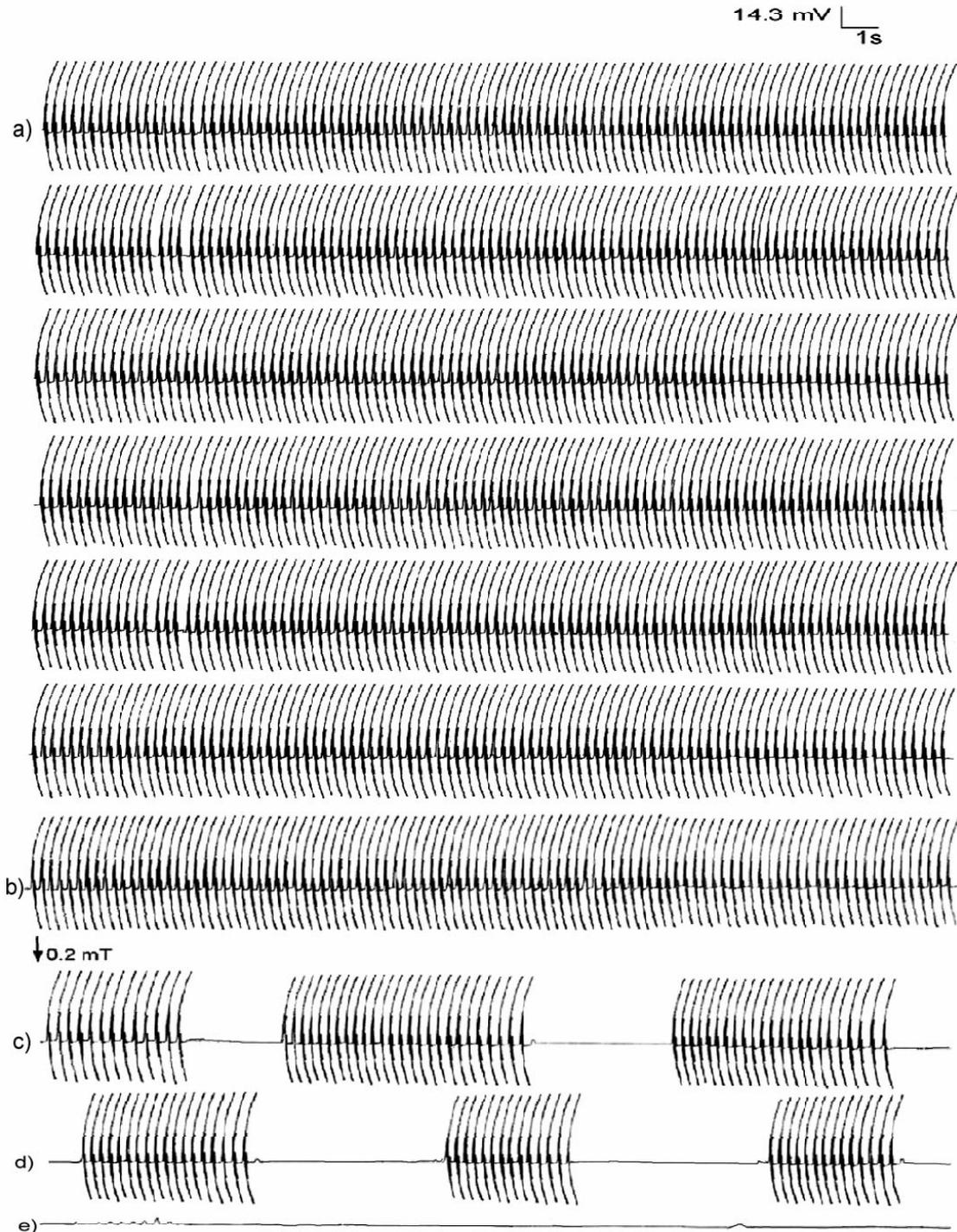


**Figura 4.32.-** Neurona V3. Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , (♦) expresada en (pot./s), en función de la inducción magnética aplicada,  $B$ , (Δ) expresada en mT y en el tiempo de duración del experimento. La actividad espontánea es  $f_0 \approx 0.8$  pot./s. Se aplica un campo magnético de frecuencia 1 Hz e intensidad en el rango de 0.2 a 1.95 mT. Cada valor de  $B$  se aplicó durante 3 min. Se observa un aumento de la frecuencia de disparo de la neurona hasta 2.6 pot./s cuando se inicia la aplicación del CMA. A continuación se produce una inhibición que alcanza 0.6 pot./s para 0.8 mT, para 1.2 y 1.64 mT la neurona recupera su actividad inicial y para 1.95 mT queda prácticamente inhibida. La duración del experimento fue de 22 minutos.

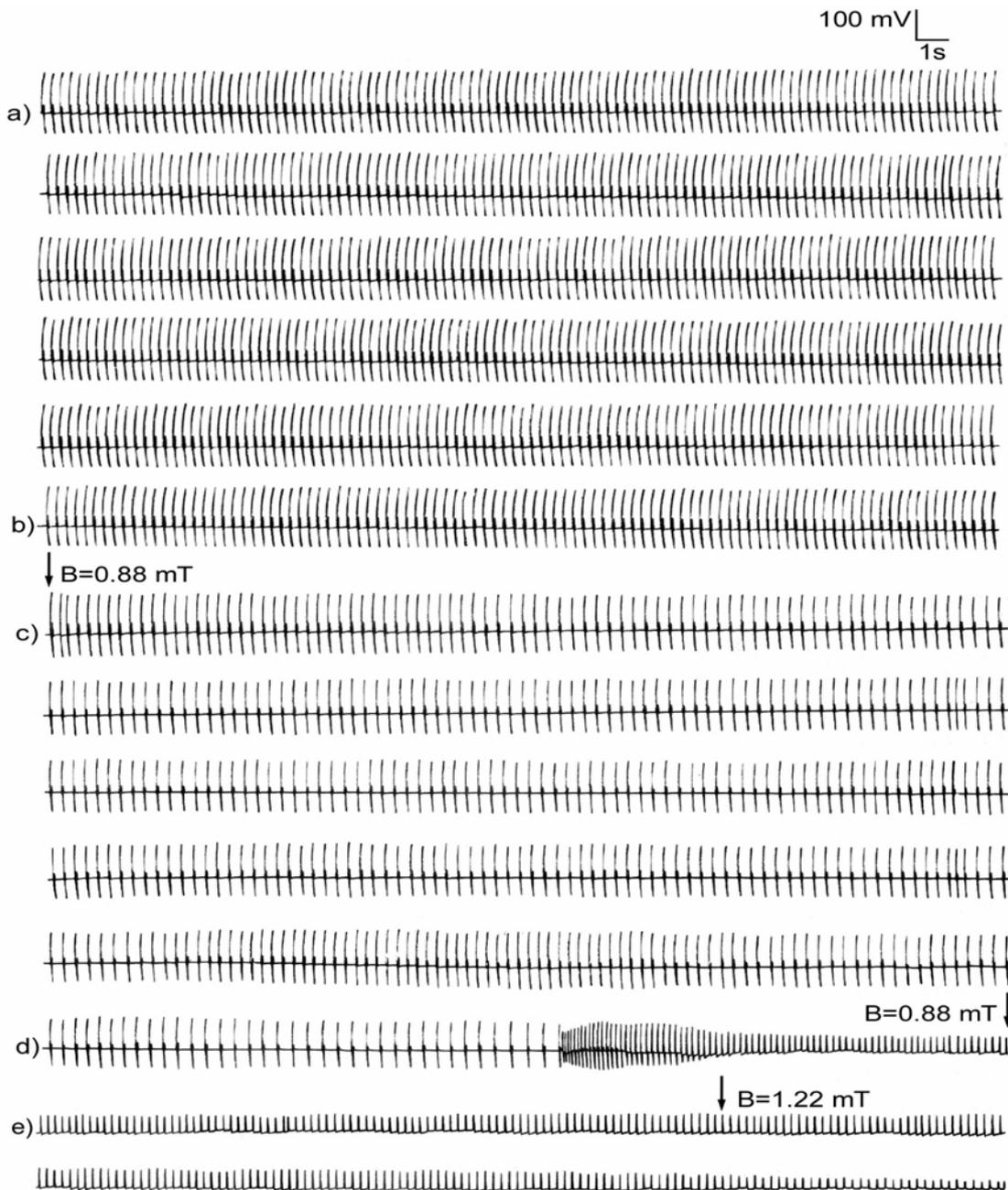
En la Fig. 4.33 se muestra la actividad de la neurona D4 del ganglio parietal izquierdo. Se induce actividad de reclutamiento para un campo magnético de intensidad 0.2 mT y frecuencia 4 Hz, que culmina con inhibición total de la neurona en 1 minuto de exposición. El tipo de respuesta inducida es similar al mostrado por la neurona D1 (Fig. 4.26).

En la Fig. 4.34 se muestra la actividad de la neurona D3 del ganglio parietal izquierdo. Para una frecuencia del CMA aplicado de 4 Hz e intensidad de 0.88 mT, se observa disminución de la frecuencia seguida de un brusco aumento de la misma y una disminución igualmente brusca de la amplitud de los potenciales. Para una intensidad de campo magnético de 1.22 mT la frecuencia continúa disminuyendo al igual que la amplitud de los potenciales.

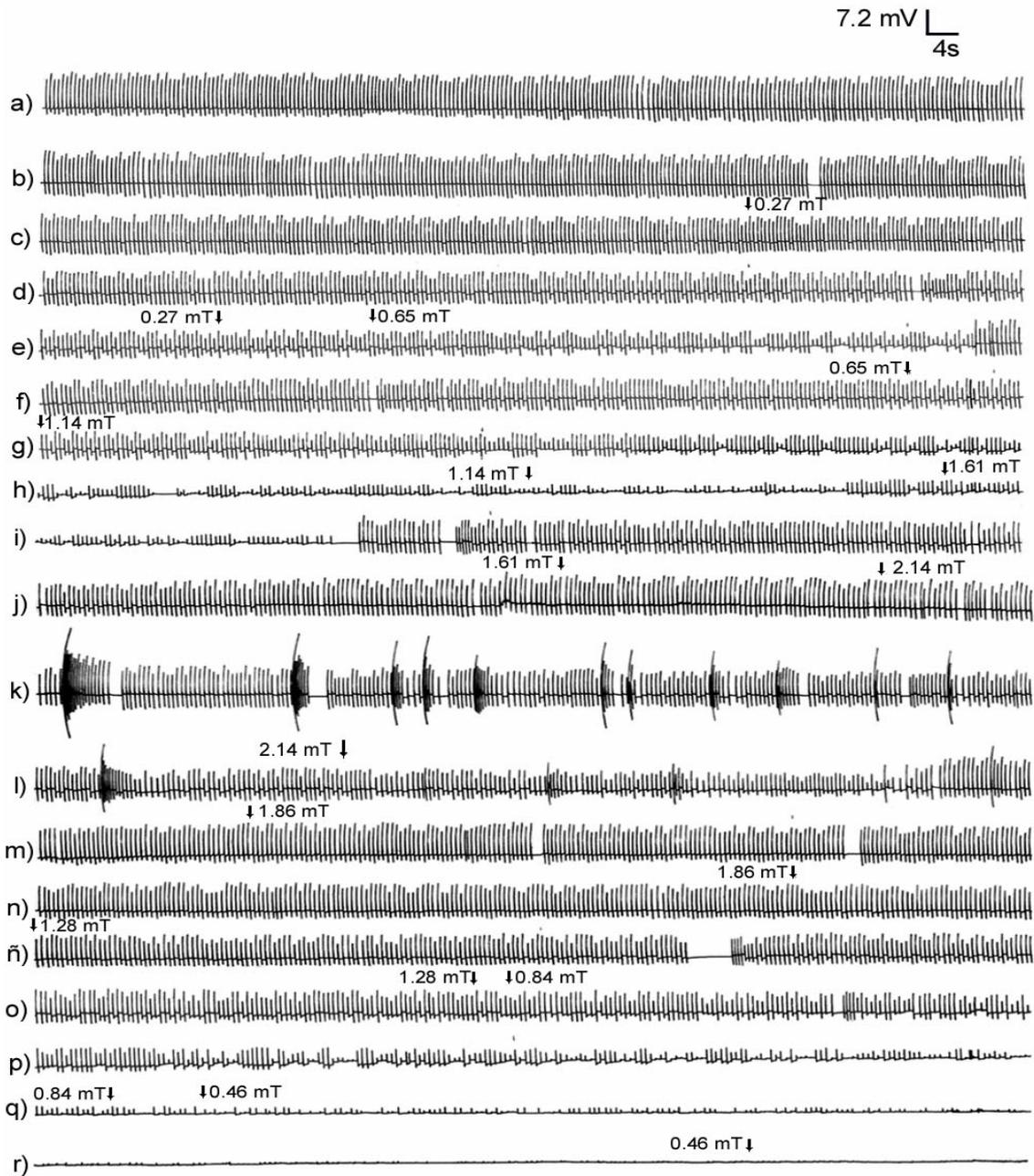
En la Fig. 4.35 se muestra la actividad de la neurona F5 del ganglio parietal derecho. Se suceden fases de disminución y aumento de la amplitud de los potenciales en el rango de intensidades de 0.27 a 1.61 mT. En los registros (k - l) se observa una actividad de reclutamiento con incrementos bruscos de amplitud (alrededor del 140%) y frecuencia seguidos de disminuciones de ambos parámetros llegándose a observar intervalos silenciosos. Registros (m - r) se inicia la disminución de la intensidad del campo y con ésta disminuye la amplitud de los potenciales hasta que la neurona es completamente inhibida para 0.46 mT.



**Figura 4.33.-** Neurona D4, frecuencia de CMA de 4 Hz e intensidad de 0.2 mT aplicado durante 3 minutos. Registro (a - b) actividad espontánea ( $f_0 \approx 4$  pot./s). Registro (c - d) bajo exposición a una intensidad de campo de 0.2 mT se induce actividad de reclutamiento. Registro e) la neurona es completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos La duración del experimento fue de 5 minutos.



**Figura 4.34.-** Neurona D3, frecuencia de CMA de 4 Hz e intensidad variable en el rango de 0.88 a 1.22 mT, cada valor de intensidad se aplica durante 3 minutos. Registro (a - b) actividad espontánea  $f_0 \approx 4.2$  pot./s. Registro (c - d) bajo exposición a una intensidad de campo de 0.88 mT, se observa a los 2'45'' minutos disminución de la frecuencia seguida de un brusco aumento de la misma y disminución en la amplitud de los potenciales. Registro e) bajo exposición a una intensidad de campo de 1.22 mT la frecuencia continúa disminuyendo al igual que la amplitud de los potenciales. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 7 minutos.



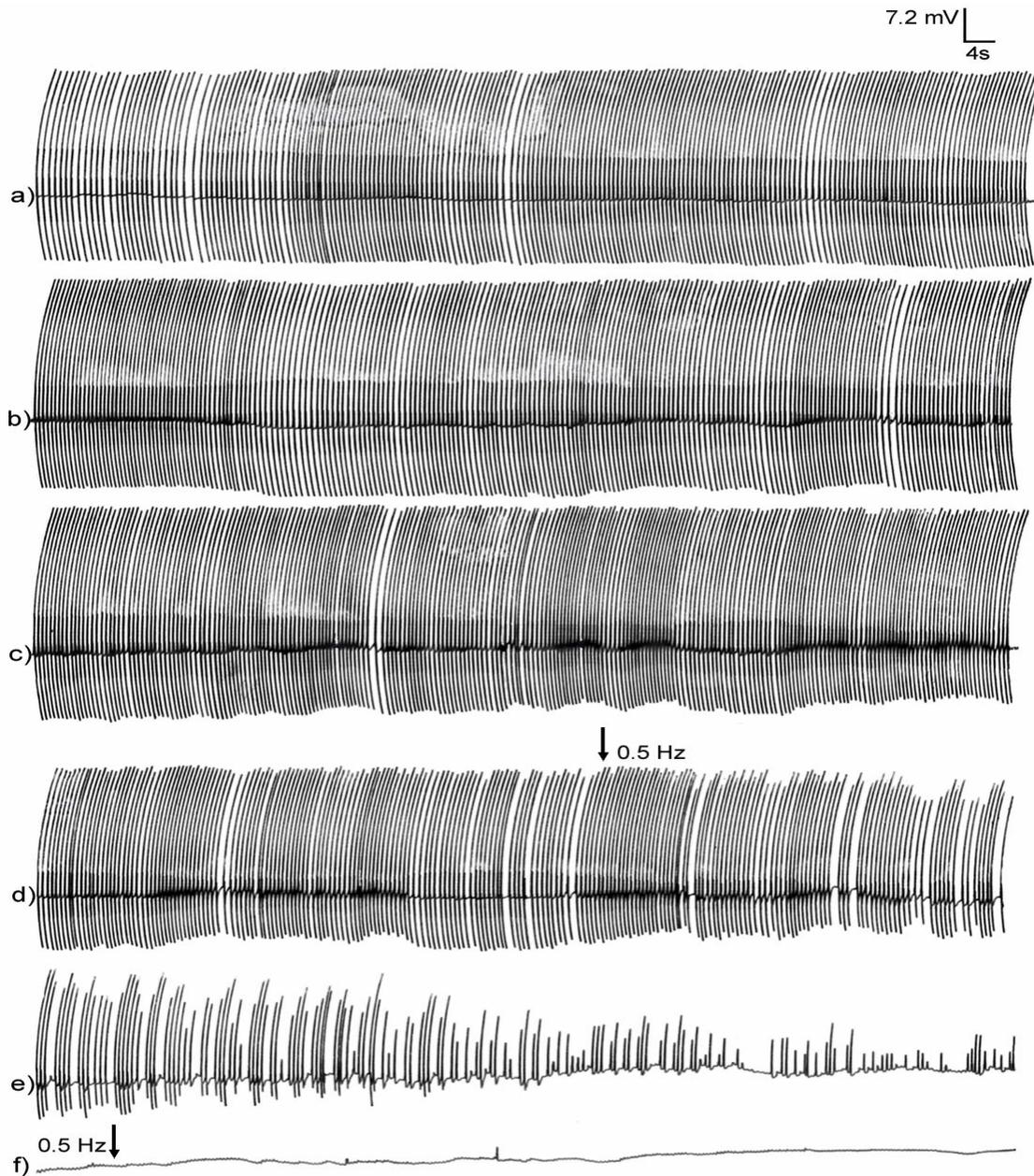
**Figura 4.35.-** Neurona F5, frecuencia de CMA de 2 Hz e intensidad variable en el rango de 0.27 a 2.14 mT y disminución hasta 0.46 mT, cada valor de intensidad se aplica durante 3 minutos. Registro (a - b) actividad espontánea  $f_0 \approx 2$  pot./s. Registro (c - j) se suceden intervalos de disminución y aumento de la amplitud de los potenciales en el rango de 0.27 a 1.61 mT. Registro (k - l) se observan incrementos bruscos de amplitud y frecuencia seguidos de disminuciones de ambos parámetros llegándose a observar intervalos silenciosos. Registros (m - r) se inicia la disminución de la intensidad del campo y con ésta disminuye la amplitud de los potenciales hasta que la neurona queda completamente inhibida para 0.46 mT. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 38 minutos.

En los experimentos mostrados en los que varía la frecuencia y la intensidad del campo magnético los patrones de respuesta para las neuronas estudiadas son similares. Se observó que las neuronas muestran mayor sensibilidad a los cambios de frecuencia que a la modificación de la intensidad del CMA aplicado. Es notable la observación de modificación simultánea de frecuencia y amplitud de los potenciales para frecuencias del campo magnético comparable con la frecuencia típica de la actividad espontánea de las neuronas.

#### **4.4.3.- BLOQUE 3. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CMA DE INTENSIDAD CONSTANTE Y VARIACIÓN CRECIENTE DE LA FRECUENCIA EN EL RANGO DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA**

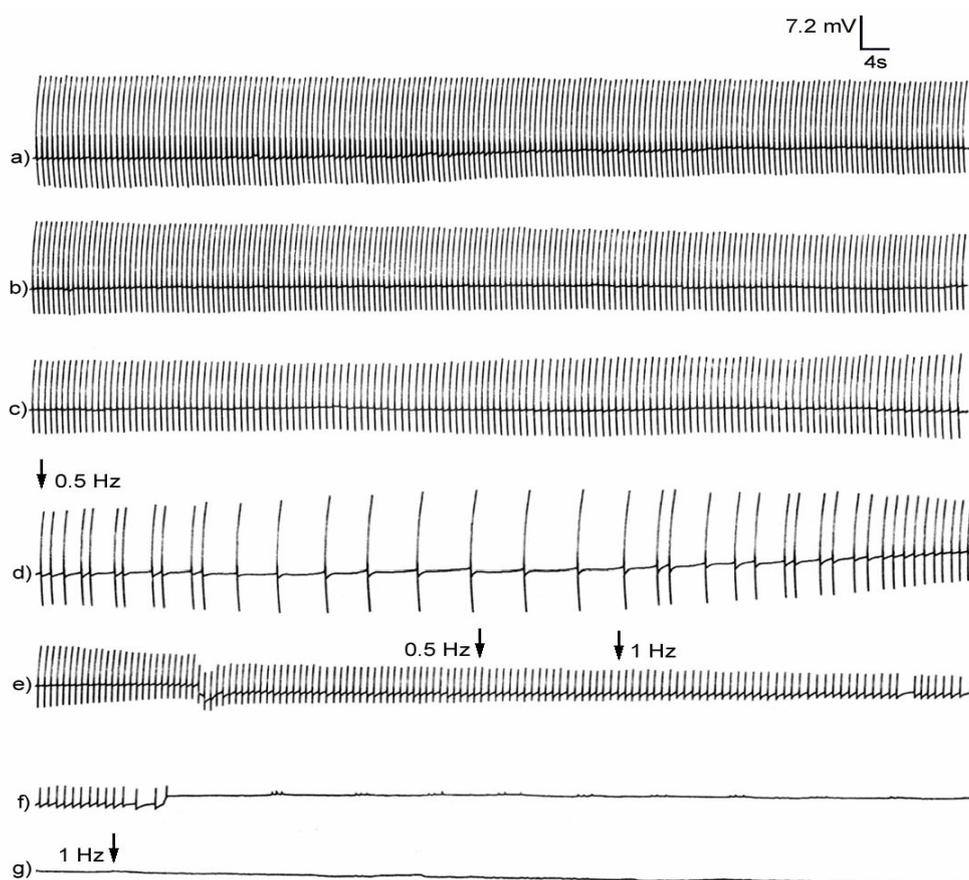
En este bloque se mantuvo una intensidad constante de 1 mT, la frecuencia se varió de forma creciente entre 0.5 y 8 Hz con tiempo de exposición de 3 min.

En la Fig. 4.36 se muestra la actividad de la neurona V14 del ganglio visceral bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencia de 0.5 Hz aplicada durante 3 minutos. Se observa disminución de la amplitud de los potenciales de forma espontánea, que es acentuada una vez que se inicia la aplicación del campo magnético. La frecuencia bajo acción del CMA disminuye y se induce actividad de reclutamiento. Una vez aplicado el campo, la disminución de frecuencia y amplitud ocurren de forma simultánea hasta que la neurona queda completamente inhibida.



**Figura 4.36.-** Neurona V14, CMA de 1 mT y frecuencia de 0.5 Hz, aplicada durante 3 minutos. Registros (a - c) actividad espontánea,  $f_0 \approx 2$  pot./s. Registro (d - f) bajo exposición a un CMA de frecuencia 0.5 Hz la amplitud y frecuencia de los potenciales bioeléctricos decrecen progresivamente hasta que la neurona queda completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 12 minutos.

En la Fig. 4.37 se muestra la actividad de la neurona F3 del ganglio parietal derecho bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 0.5 Hz y 1 Hz, cada una aplicada durante 3 minutos. Es de destacar que al iniciar la aplicación del campo magnético la sensibilidad de la neurona se manifiesta con cambios simultáneos y contrarios en frecuencia y amplitud, brindándole al registro una morfología característica. Se observa una importante disminución de la frecuencia de los potenciales y un aumento de la amplitud seguido de una recuperación de la frecuencia y una disminución de la amplitud. Para 1 Hz la amplitud y la frecuencia disminuyen hasta que la neurona es completamente inhibida.

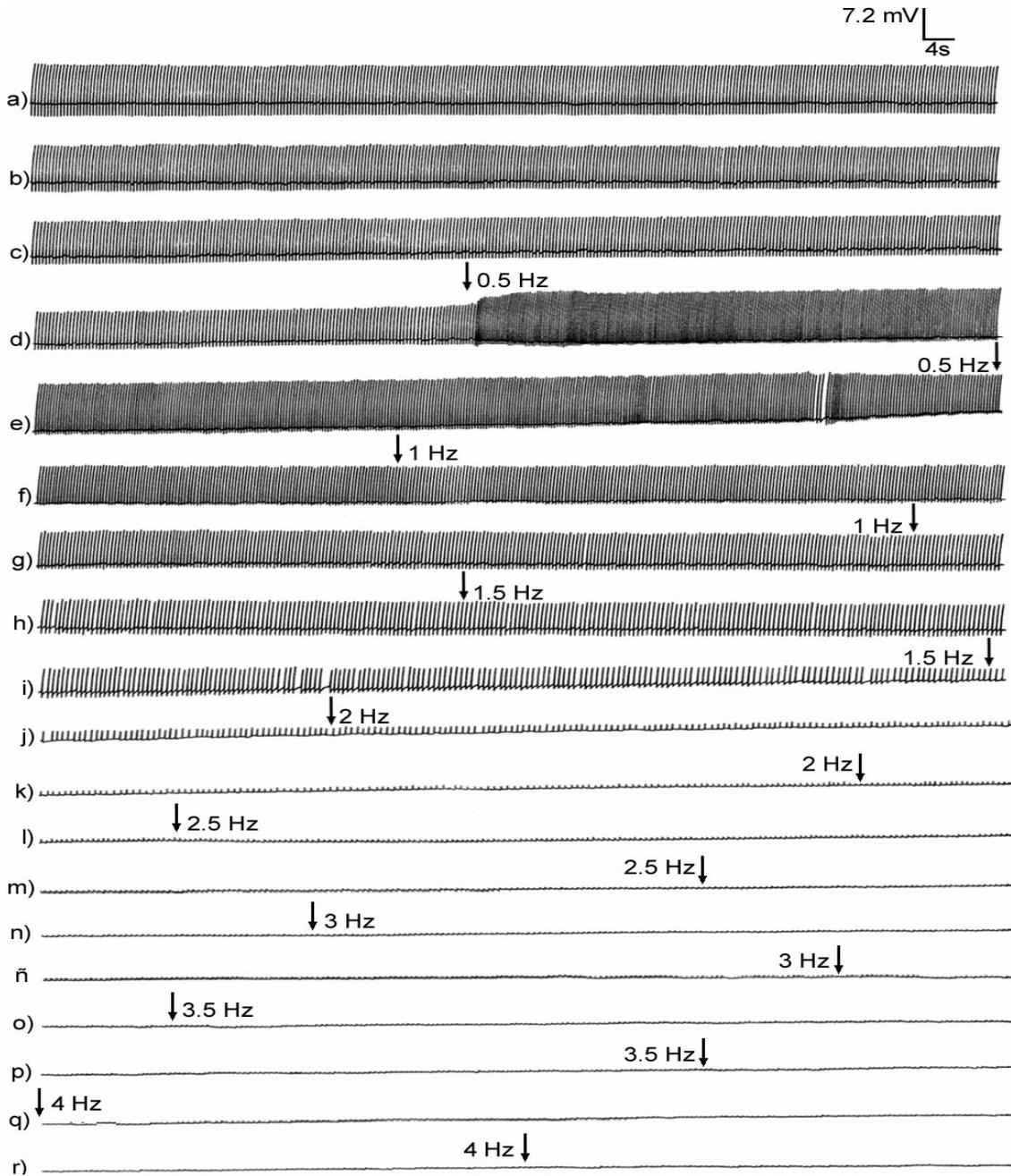


**Figura 4.37.-** Neurona F3, CMA de 1 mT y frecuencias de 0.1 y 1 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 3 minutos. Registros (a - c) actividad espontánea,  $f_0 \approx 1.5$  pot./s. Registro (d - e) bajo acción de un CMA de 0.5 Hz la frecuencia de los potenciales decrece y la amplitud aumenta seguido de una recuperación de la frecuencia y una disminución de la amplitud. Registro (e - g) bajo exposición a un CMA de frecuencia 1 Hz la amplitud y frecuencia de los potenciales decrecen progresivamente hasta que la neurona queda completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 14 minutos.

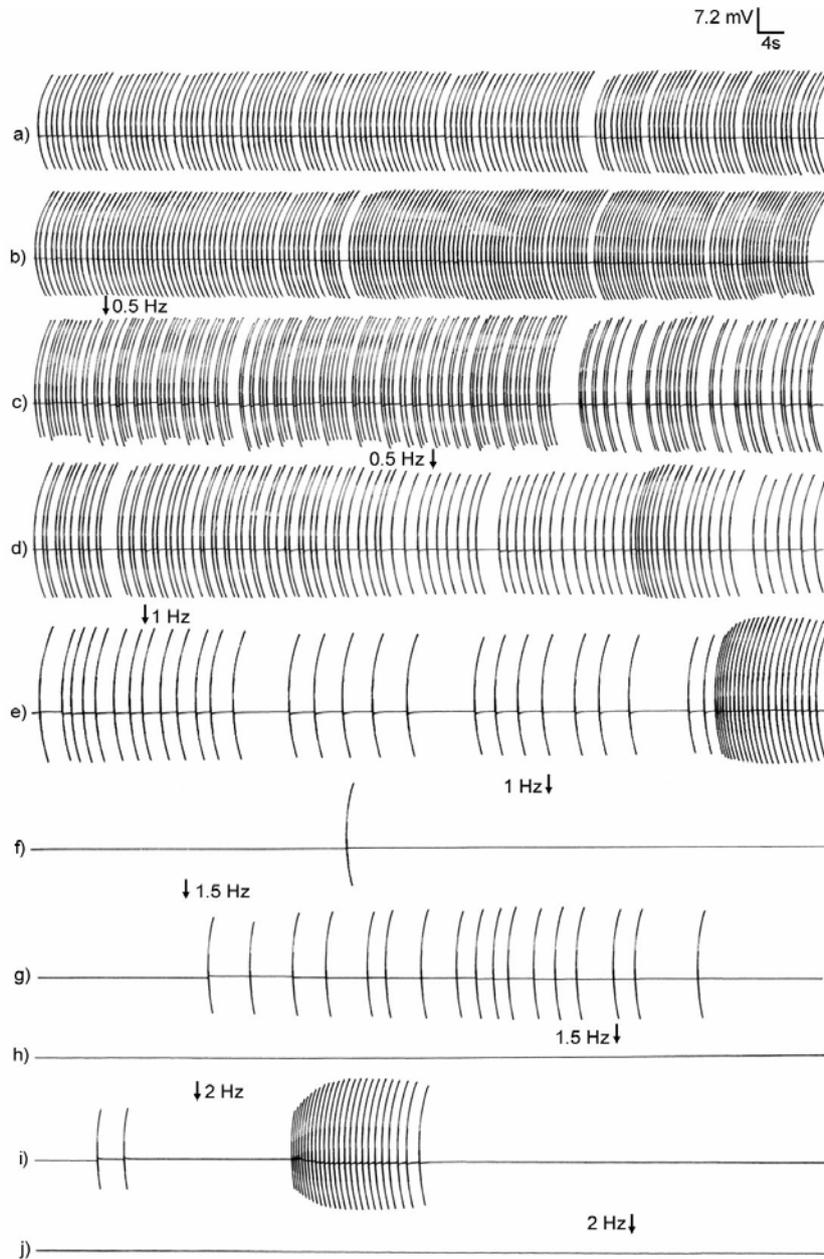
En la Fig. 4.38 se muestra la actividad de la neurona F22 del ganglio parietal derecho bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 0.5 a 4 Hz cada una aplicada durante 3 minutos. Se observa una tendencia a la disminución de la amplitud de los potenciales de forma espontánea. Una vez aplicado un campo magnético de frecuencia 0.5 Hz la amplitud y frecuencia de los potenciales bioeléctricos aumentan simultáneamente. Esta estimulación es aún visible para los 2 primeros minutos de aplicación del CM de frecuencia 1 Hz y en el último minuto desaparece, restableciéndose los valores iniciales de frecuencia y amplitud (2.6 pot./s y 8 mV). Para el rango de 1.5 a 4 Hz la frecuencia y amplitud de los potenciales disminuye progresivamente hasta que la neurona queda completamente inhibida.

En la Fig. 4.39 se muestra la actividad de la neurona F2 del ganglio parietal derecho bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 0.5 a 2 Hz cada una aplicada durante 3 minutos. Bajo la acción del CMA se acentúa la actividad de reclutamiento y la frecuencia de los potenciales disminuye. Es de destacar la modificación de actividad bioeléctrica caracterizada por incrementos bruscos de la frecuencia y amplitud para las frecuencias de CMA de 1 y 2 Hz.

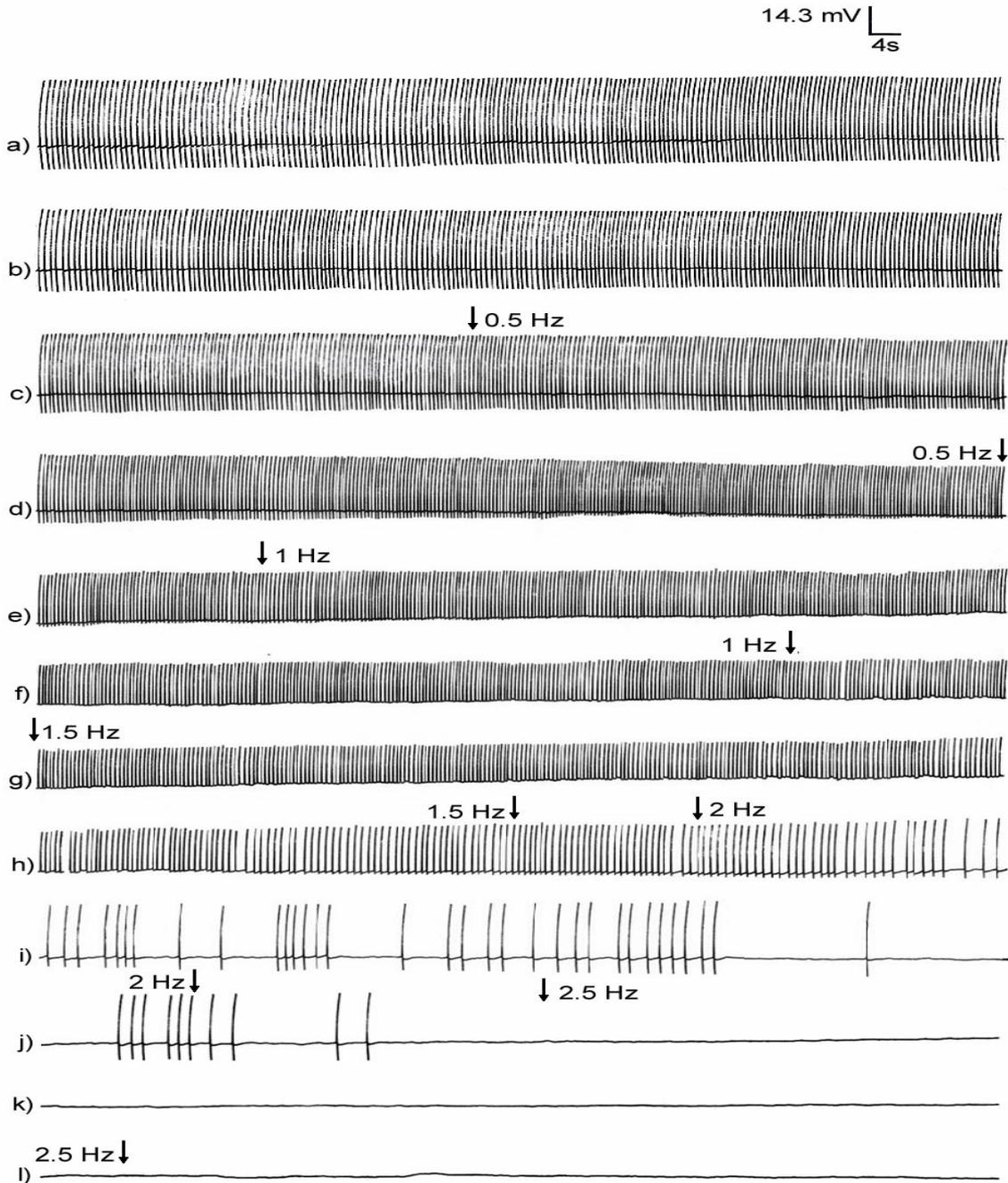
En la Fig. 4.40 se muestra la actividad de la neurona V14 del ganglio visceral bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 0.5 a 2.5 Hz, cada una aplicada durante 3 minutos. Bajo la acción de un campo magnético de frecuencias 0.5, 1 y 1.5 Hz disminuye la amplitud de los potenciales, observándose que esta disminución se debe fundamentalmente a la reducción de la hiperpolarización. Para el último minuto de aplicación de la frecuencia de 1.5 Hz y para 2 Hz la frecuencia de los potenciales disminuye y la amplitud aumenta recuperándose la hiperpolarización. Para un CMA de frecuencia 2.5 Hz la neurona queda completamente inhibida.



**Figura 4.38.-** Neurona F22, CMA de 1 mT y frecuencia variable en el rango de 0.5 a 4 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 3 minutos. Registros (a - c) actividad espontánea,  $f_0 \approx 2.6$  pot./s. Registros (d - e) bajo exposición a un CMA de frecuencia 0.5 Hz se observa un brusco incremento de la frecuencia de los potenciales acompañada de un aumento en la amplitud de los mismos. Registro (f - g) la neurona se encuentra ligeramente estimulada. Registros (h - r) la amplitud y frecuencia de los potenciales disminuyen hasta que la neurona queda completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 38 minutos.



**Figura 4.39.-** Neurona F2, CMA de 1 mT y frecuencia variable en el rango de 0.5 a 2 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 3 minutos. Registros (a - b) actividad espontánea,  $f_0 \approx 1.5$  pot./s. Registros (c - d) bajo exposición a un CMA de frecuencia 0.5 Hz se acentúa la actividad de reclutamiento y en el paso de 0.5 a 1 Hz se observa un intervalo de incremento de frecuencia y amplitud, seguida de disminución de ambos parámetros. Registros (e - j) se suceden intervalos de estimulación e inhibición total, observándose para las frecuencias de 1 y 2 Hz estimulaciones bruscas de la frecuencia y amplitud. Para 2 Hz la neurona queda completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 20 minutos.



**Figura 4.40.-** Neurona V14, CMA de 1 mT y frecuencia variable en el rango de 0.5 a 2.5 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 3 minutos. Registros (a - b) actividad espontánea,  $f_0 \approx 2$  pot./s. Registros (c - g) bajo exposición a un CMA de frecuencias entre 0.5 y 1.5 Hz disminuye la amplitud de los potenciales bioeléctricos. Registros (h - j) bajo exposición a un CMA de frecuencia 1.5 y 2 Hz disminuye la frecuencia de los potenciales y aumenta la amplitud. Registros (j - k) para 2.5 Hz la neurona queda completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 24 minutos.

#### **4.4.4.- BLOQUE 4. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CMA DE INTENSIDAD CONSTANTE Y FRECUENCIA VARIABLE ALREDEDOR DE LA FRECUENCIA ESPONTÁNEA DE LA NEURONA**

A partir de los resultados obtenidos del bloque 3, se desarrolló un cuarto bloque de experimentos manteniendo la intensidad del campo magnético constante en 1mT, la frecuencia del campo se hizo coincidir con la frecuencia típica de la actividad espontánea de la neurona (0.1 a 5 Hz). La  $f_m$  se varió alrededor de estos valores, utilizándose un tiempo de exposición de 10 minutos.

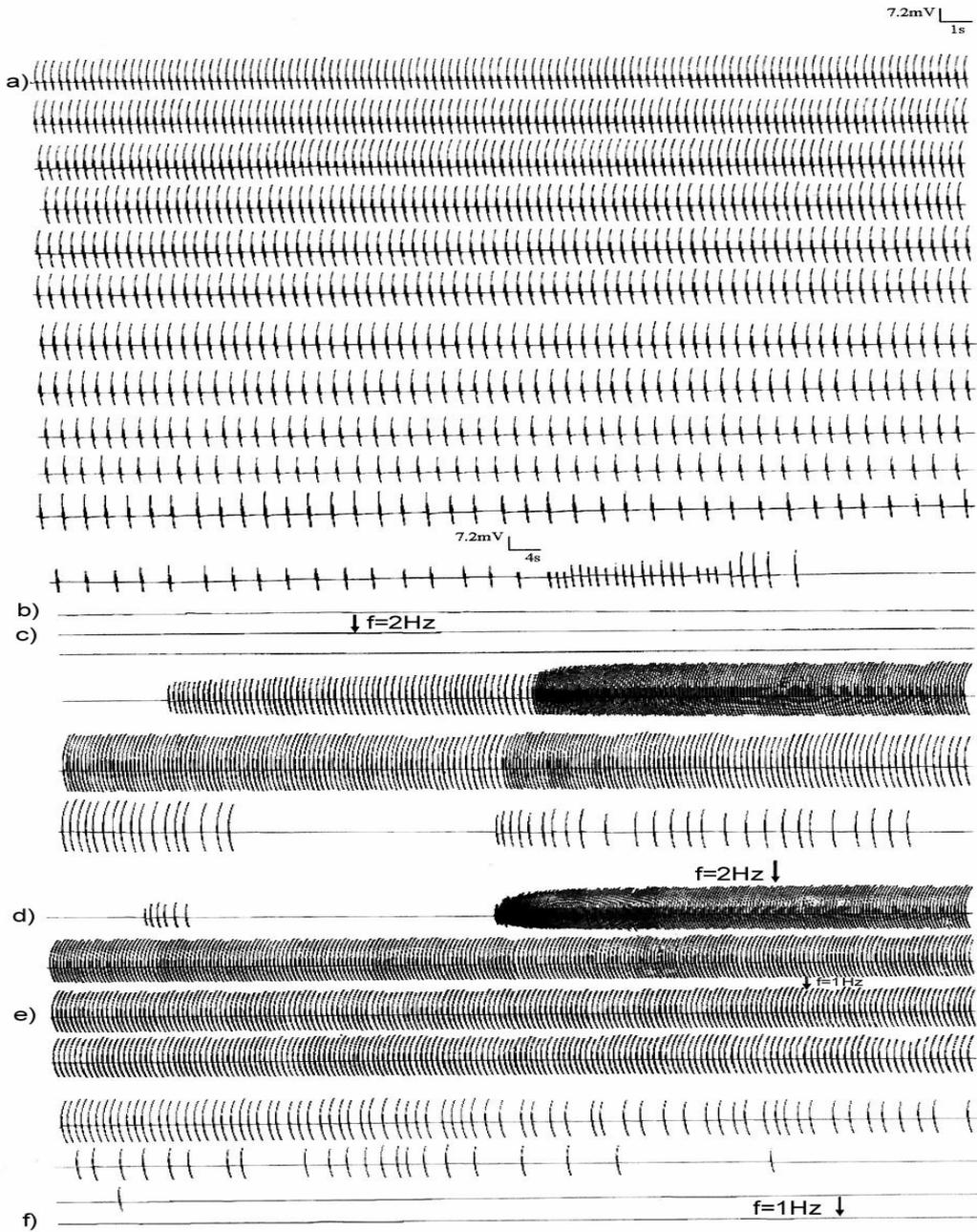
En la Fig. 4.41 se muestra la actividad de la neurona V19 del ganglio visceral bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 2 y 1 Hz con tiempo de aplicación de 10 minutos. De forma espontánea la frecuencia y la amplitud decrecen progresivamente hasta que la neurona queda completamente inhibida. Para una frecuencia de 2 Hz, aproximadamente igual a la frecuencia de la actividad espontánea, la neurona es estimulada, se repite la actividad de incremento simultáneo de la frecuencia y amplitud de los potenciales. Finalmente para 1 Hz la frecuencia y amplitud de los potenciales decrecen hasta que la neurona queda completamente inhibida.

En la Fig. 4.42 se muestra la actividad de la neurona F9 del ganglio parietal derecho bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 2, 3 y 4 Hz con tiempo de aplicación de 10 minutos. De forma espontánea la frecuencia de los potenciales disminuye y la amplitud aumenta. A los 4 minutos de iniciado el experimento la neurona queda completamente inhibida. Al igual que en el experimento representado en la Fig. 4.41 cuando la frecuencia del CMA es similar a la frecuencia de la actividad espontánea de la neurona se observan marcados efectos, representados por incrementos simultáneos de la frecuencia y amplitud de los potenciales. Un CMA de 2 Hz no estimula. La estimulación se obtiene para una frecuencia de 3 Hz, idéntica a la frecuencia espontánea. La neurona no responde para 4 Hz y a los 12 minutos es nuevamente estimulada por el CMA de 3 Hz.

En la Fig. 4.43 se muestra la actividad de la neurona V18 del ganglio visceral bajo la acción de un campo magnético de 1 mT y frecuencias de 1 y 3 Hz con tiempo de aplicación de 10 minutos. Se suceden potenciales de diferentes amplitudes con

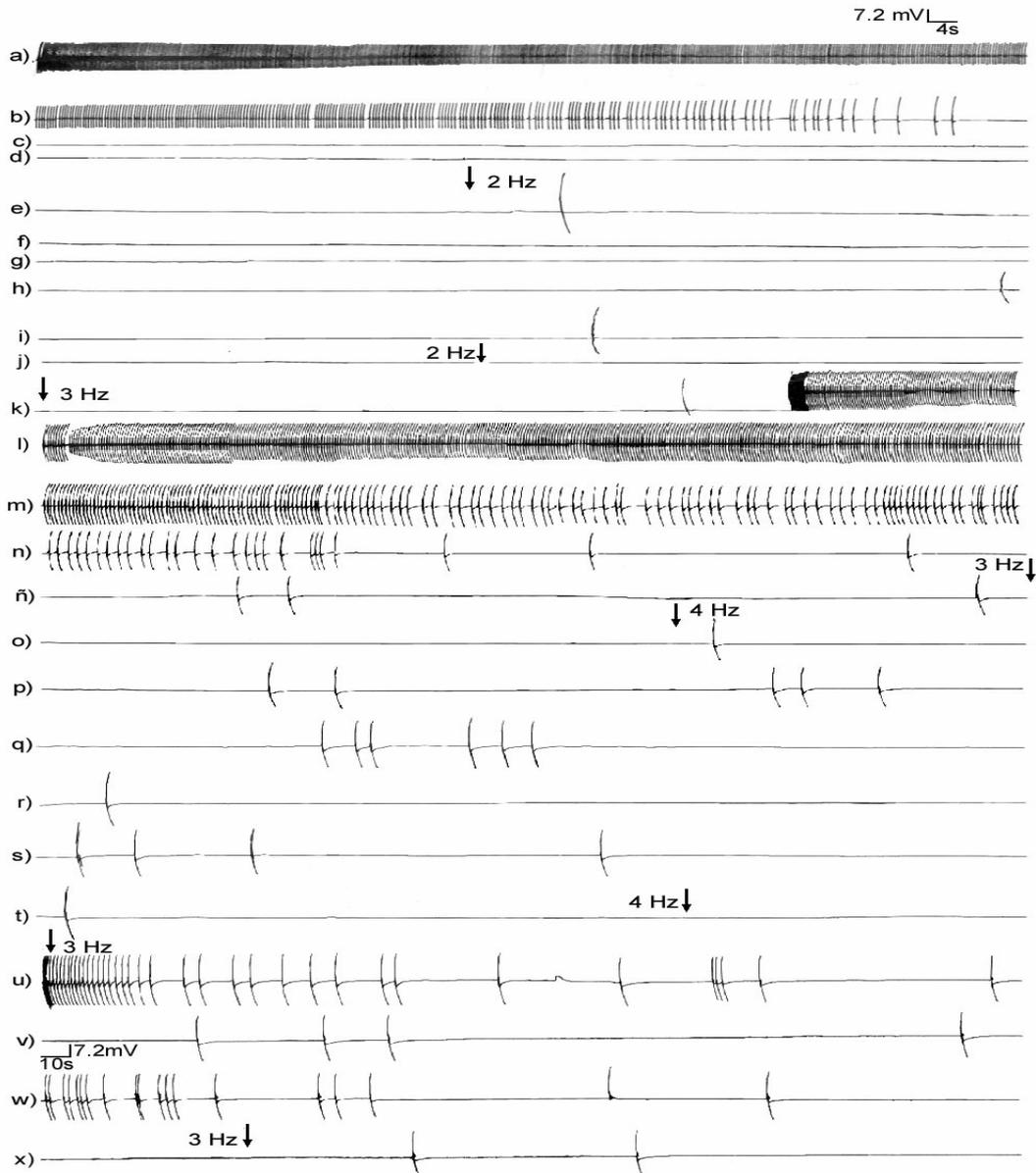
cambios en la fase de despolarización e hiperpolarización. La tendencia general es la disminución de la amplitud y se observa que la onda de baja amplitud no hiperpolarizada termina imponiéndose al final del experimento. Para un corto intervalo de 4 minutos bajo exposición a CMA de frecuencia 3 Hz, se observa un aumento simultáneo de la amplitud y frecuencia de los potenciales.

Los experimentos realizados parecen apuntar hacia la existencia de una ventana en frecuencia, es decir, la existencia de un valor de frecuencia para cada neurona para el cual la respuesta inducida es máxima. Por esta razón los siguientes experimentos se realizaron variando de forma continua los valores de frecuencia que están comprendidos en el ancho de la ventana de frecuencia alrededor de la frecuencia típica de la actividad espontánea de la neurona.

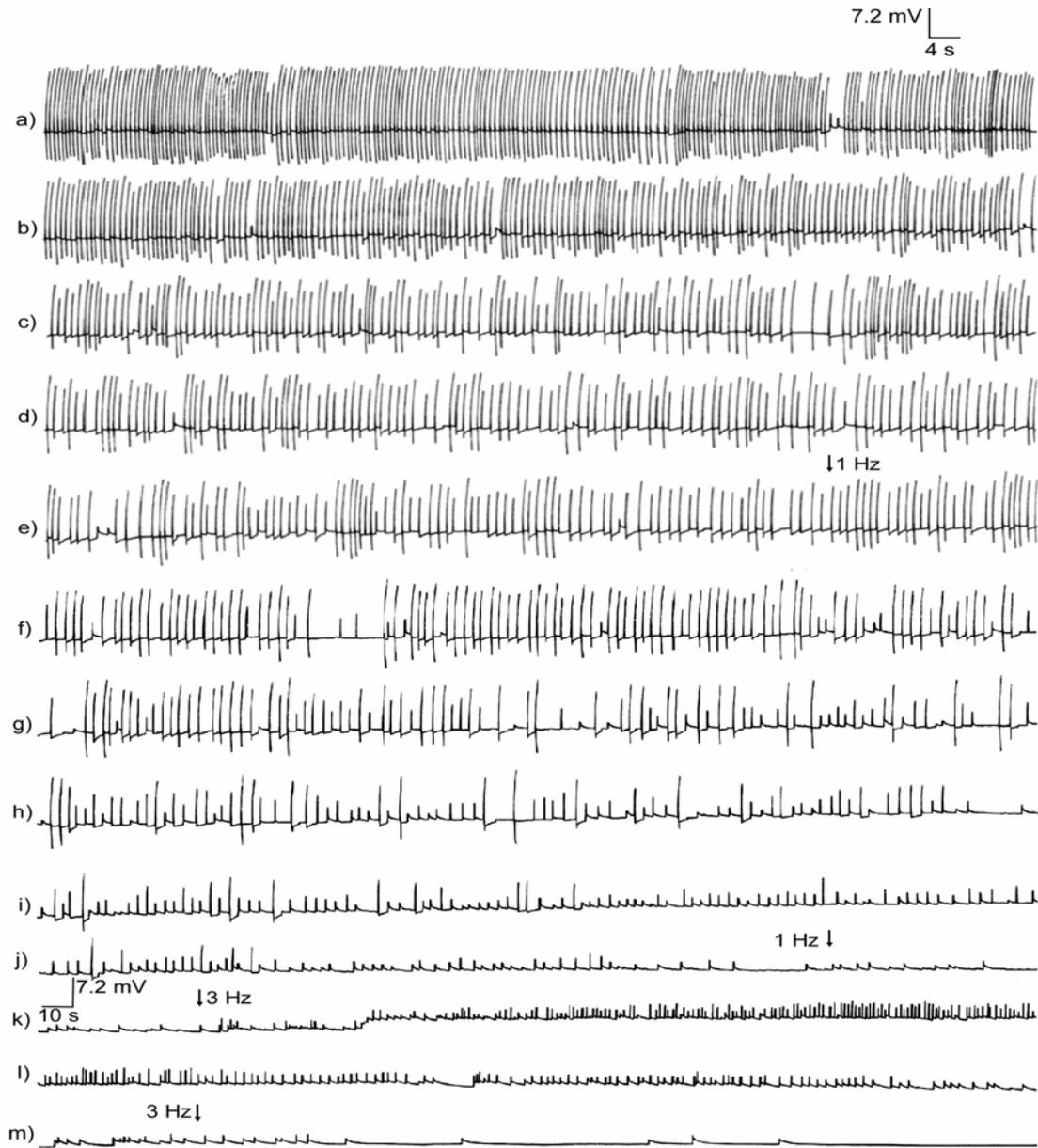


**Figura 4.41.-** Neurona V19, CMA de 1 mT y frecuencias de 2 y 1 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 10 minutos. Registros (a - b) actividad espontánea,  $f_0 \approx 2.2$  pot./s, la frecuencia y la amplitud decrecen progresivamente y la neurona es inhibida a los 6 minutos de iniciado el experimento. Registro (c - d) para una frecuencia de 2 Hz (similar a la frecuencia de la actividad espontánea) y a los 4 minutos de aplicación del campo magnético la neurona es estimulada con variaciones bruscas de la frecuencia y amplitud de los potenciales, situación que se repite a los 11 minutos. Registros (e - f) para una frecuencia de 1 Hz la frecuencia y amplitud de los potenciales decrecen hasta que la neurona queda completamente inhibida. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 35 minutos.

RESULTADOS



**Figura 4.42.-** Neurona F9, CMA de 1 mT y frecuencias de 2, 3 y 4 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 10 minutos. Registros (a - d) actividad espontánea,  $f_0 \approx 3$  pot./s, la frecuencia de los potenciales disminuye y la amplitud aumenta. A los 4 minutos de iniciado el experimento la neurona queda inhibida de forma espontánea. Registros (e - j) bajo acción de un CMA de frecuencia 2 Hz se observan potenciales aislados. Registros (k - ñ) bajo exposición a un CMA de 3 Hz (similar a la frecuencia de la actividad espontánea) observamos incrementos simultáneos de la frecuencia y amplitud de los potenciales. Registros (o - t) bajo acción de un CMA de frecuencia 4 Hz se observan potenciales aislados. Registros (u - x) bajo exposición a un CMA de 3 Hz se repite el efecto observado 20 minutos antes, bajo estas mismas condiciones, aunque con menor intensidad. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 60 minutos.



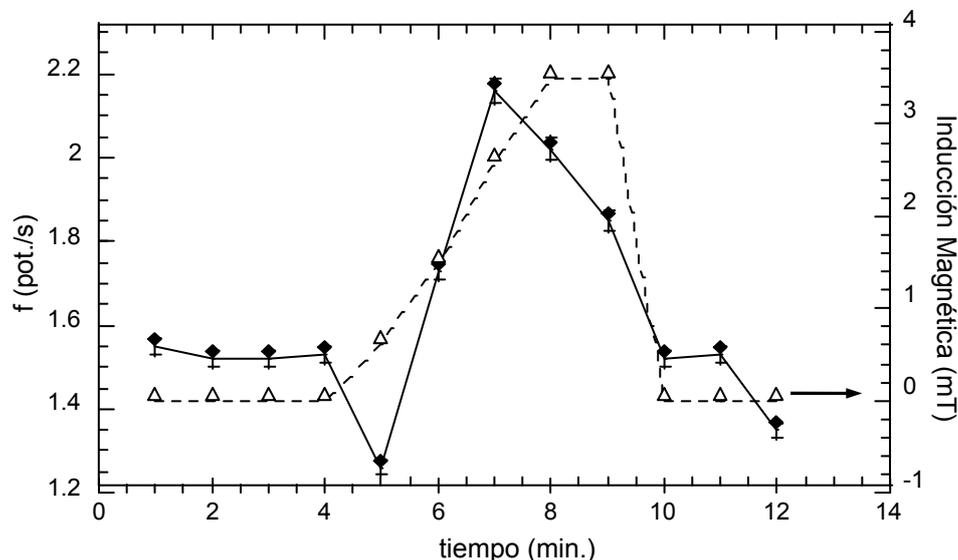
**Figura 4.43.-** Neurona V18, CMA de 1 mT y frecuencias de 1 y 3 Hz, cada valor de frecuencia se aplica durante 10 minutos. Registros (a - d) actividad espontánea,  $f_0 \approx 1.5$  pot./s. Se suceden potenciales de amplitud variable y tendencia a la disminución de la frecuencia. Registros (e - j) bajo acción de un CMA de frecuencia 1 Hz se van imponiendo los potenciales de baja amplitud. No se observan modificaciones importantes de la frecuencia. Registros (k - m) bajo exposición a un CMA de frecuencia 3 Hz se observa incremento de la frecuencia de los potenciales y ligero aumento de la amplitud. Los registros donde se aplica CM son continuos. La duración del experimento fue de 35 minutos.

#### **4.4.5.- BLOQUE 5. ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO CONDICIONES NO HABITUALES EN NUESTRA EXPERIMENTACIÓN**

##### **4.4.5.1.- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO DE 217 Hz**

Una vez analizados los resultados obtenidos, realizamos un bloque de experimentos con el objeto de estudiar la actividad bioeléctrica neuronal para valores de frecuencia e intensidad del CMA alejados de los rangos que hasta el momento veníamos abordando “no habituales en nuestra experimentación”. Para ello se desarrollaron dos grupos de experimentos. En el primer grupo se aplicó un campo electromagnético sinusoidal con una frecuencia constante de 217 Hz y una intensidad que varió desde 0.65 a 3.5 mT. Cada valor de intensidad se aplicó durante 1 minuto. 217 Hz es una frecuencia de modulación que se utiliza en la telefonía GSM.

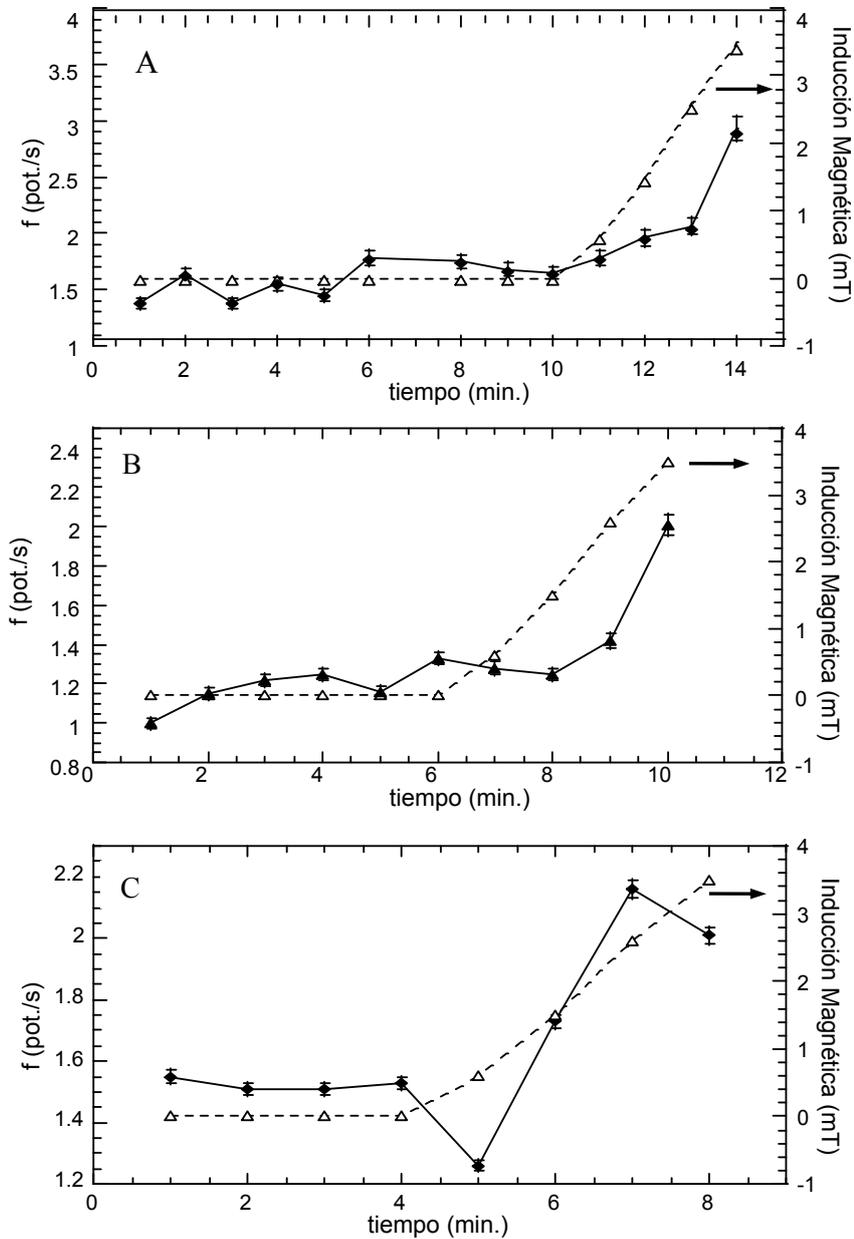
En la Fig. 4.44 se muestra la evolución de la actividad bioeléctrica de la neurona V17 del ganglio visceral mediante una representación gráfica. Se representa la modificación de la frecuencia de los potenciales bioeléctricos en función de la inducción magnética aplicada en el tiempo de desarrollo del experimento. La respuesta es bifásica con una disminución de la frecuencia de disparo para un valor de inducción magnética de 0.65 mT, seguida de un aumento de la misma para 1.5 mT. Para el valor de inducción magnética máximo (3.5 mT) la frecuencia de la neurona comienza a disminuir y para el valor nulo del campo magnético la frecuencia de la neurona alcanza un valor de frecuencia próximo al inicial, es decir el efecto inducido por el campo es reversible. Es notable la similitud, en el tiempo, entre el gráfico que representa la variación de la frecuencia de la neurona y el que representa la variación de la inducción magnética aplicada.



**Figura 4.44.-** Neurona V17. Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , (♦) expresada en (pot./s), en función de la inducción magnética aplicada, ( $\Delta$ ) expresada en mT y en el tiempo de duración del experimento. Se aplica un campo magnético de frecuencia 217 Hz e intensidad en el rango de 0.65 a 3.5 mT. Cada valor de CM se aplicó durante 1 min. La actividad espontánea es  $f_0 \approx 1.5$  pot./s. Después de una disminución de la frecuencia de la neurona para un CM de 0.65 mT, la frecuencia de los potenciales aumenta con el incremento del campo. Para el mayor valor del CM aplicado (3.6 mT) la frecuencia comienza a disminuir y al final del experimento, en ausencia de CM, la frecuencia de la neurona es de 1.4 pot./s. La duración del experimento fue de 12 minutos.

En la Fig. 4.45 se muestra la actividad de la neurona V17, del ganglio visceral. El experimento se repite tres veces. El tiempo transcurrido entre cada uno de los experimentos es de 8 minutos. Se ha representado una gráfica para cada uno de los experimentos realizados (A, B, C). En cada gráfica se representa exclusivamente el efecto inducido con el aumento de  $B_0$ . Para cada uno de los experimentos se siguió la misma pauta de experimentación: aumento y disminución de  $B_0$ , recuperación de la actividad de la neurona al valor de su frecuencia característica y nueva aplicación de  $B_0$ . Se observa que el efecto inducido por el campo (gráfico A) es reversible ya que a los 8 minutos de haber finalizado la exposición al CMA la neurona recupera el valor de la frecuencia espontánea (gráfico B). El efecto es repetitivo pues la respuesta inducida al aumentar la intensidad del CMA es la misma en los tres experimentos, incremento de la frecuencia de los potenciales con el aumento de la intensidad del CMA.

RESULTADOS

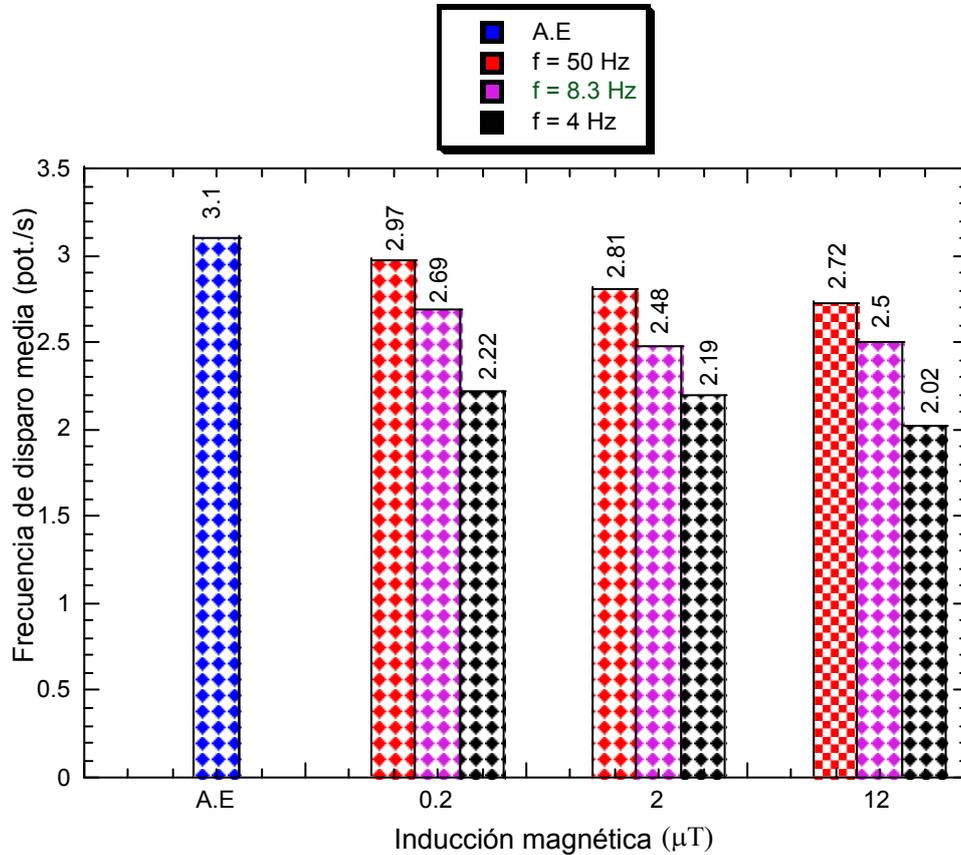


**Figura 4.45.-** Neurona V17. Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , ( $\blacklozenge$ ) expresada en (pot./s), en función de la inducción magnética aplicada, ( $\Delta$ ) expresada en mT y en el tiempo de duración del experimento. Se muestra la respuesta de la neurona con el incremento del CM. Se aplica un campo magnético de frecuencia 217 Hz e intensidad en el rango de 0.65 a 3.5 mT. La actividad espontánea es  $f_0 \approx 1.5$  pot./s. Cada valor de campo magnético se aplicó durante 1 min. El tiempo entre cada uno de los experimentos (A, B, C) fue de 8 minutos. Una vez que la neurona recuperó la actividad espontánea en el primer experimento (A) la exposición fue repetida siguiendo la misma pauta. (B, C) la frecuencia de los potenciales aumenta con el incremento del CMA aplicado. Se observa la reversibilidad del efecto inducido. La duración del experimento fue de 48 minutos.

#### **4.4.5.2.- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO ACCIÓN DE UN CAMPO MAGNÉTICO DEL ORDEN DE LOS $\mu\text{T}$**

En el segundo grupo de experimentos se aplicó un campo electromagnético sinusoidal de frecuencia constante e igual a 50 Hz (red eléctrica), 8.3 Hz (modulación en telefonía GSM) y 4 Hz (frecuencia próxima a la natural de la neurona) e intensidad de 0.2, 2 y 12  $\mu\text{T}$ . Debido a que estos valores de inducción magnética son más bajos que los aplicados en los experimentos anteriores (tres ordenes de magnitud) se mejoraron las condiciones de apantallamiento electromagnético. El diseño y construcción de una instalación experimental (Fig. 3.12), formada por una cámara de mumetal disminuyó el ruido electromagnético en la zona de experimentación (se midieron para la componente continua y alterna en el exterior 30.28  $\mu\text{T}$  y 0.30  $\mu\text{T}$  y en el interior 0.24  $\mu\text{T}$  y 0.14  $\mu\text{T}$  respectivamente).

En la Fig. 4.46 se han representado en el mismo gráfico tres experimentos realizados de forma consecutiva con la misma neurona. De esta forma podemos observar el efecto del CMA en la actividad bioeléctrica neuronal para cada valor de inducción magnética y de forma global. Se observa que la frecuencia de los potenciales bioeléctricos decrece con la disminución de la frecuencia del CMA aplicado y con el aumento de la inducción magnética, poniéndose de manifiesto que la variación máxima de la frecuencia de la neurona se observa para la frecuencia del CMA aplicado más próxima a la frecuencia de la actividad espontánea de la neurona (3.1 pot./s) y para el valor más alto de  $B_0$ . Es decir las alteraciones máximas se corresponden con una frecuencia de 4 Hz e inducción magnética de 12  $\mu\text{T}$ .



**Fig. 4.46.-** Neurona V16. Se representa la frecuencia de disparo media, expresada en (pot./s.), en función de la inducción magnética aplicada, expresada en  $\mu\text{T}$ . La actividad espontánea es  $f_0 \approx 3.1$  pot./s. Se aplicó un campo magnético de frecuencias 50, 8.3 y 4 Hz e inducción magnética de 0.2, 2 y 12  $\mu\text{T}$ . A.E representa la actividad espontánea (ausencia de CM). Para cada valor de CM la frecuencia de los potenciales disminuye a medida que decrece la frecuencia del campo magnético y con respecto a la frecuencia de la AE. En todo el experimento con el aumento del campo magnético disminuye la frecuencia de los potenciales. Para la frecuencia de 4 Hz y  $B_0 = 12 \mu\text{T}$  se observa el mayor efecto del CMA. La duración del experimento fue de 123 minutos.

#### 4.4.5.3- ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO VARIACIONES DE TEMPERATURA DE LA SOLUCIÓN RINGER EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE CAMPO MAGNÉTICO

Partiendo de la idea de que la membrana es un cristal líquido, cuya estructura cambia con la temperatura, T de la misma, se realizaron experimentos preliminares con la finalidad de mostrar el efecto de la temperatura en la actividad bioeléctrica de las neuronas, consecuencia de la variación de la fluidez de la membrana neuronal y se compara con el efecto de un campo magnético. Asimismo se aplica campo magnético estático (CME) para comparar los efectos bien conocidos del mismo y así poder elucidar el efecto térmico.

*Helix aspersa* es poiquilotermio por lo que sus ganglios cerebroideos facilitan el estudio de los efectos de las variaciones de temperatura en la actividad electrofisiológica y la determinación de las temperaturas para las cuales se producen las transiciones de fase de los cristales líquidos que forman los fosfolípidos mayoritarios de la membrana. Nótese que en nuestro caso operamos con transiciones de fase *in vitro*, contrariamente a los experimentos realizados con membranas artificiales.

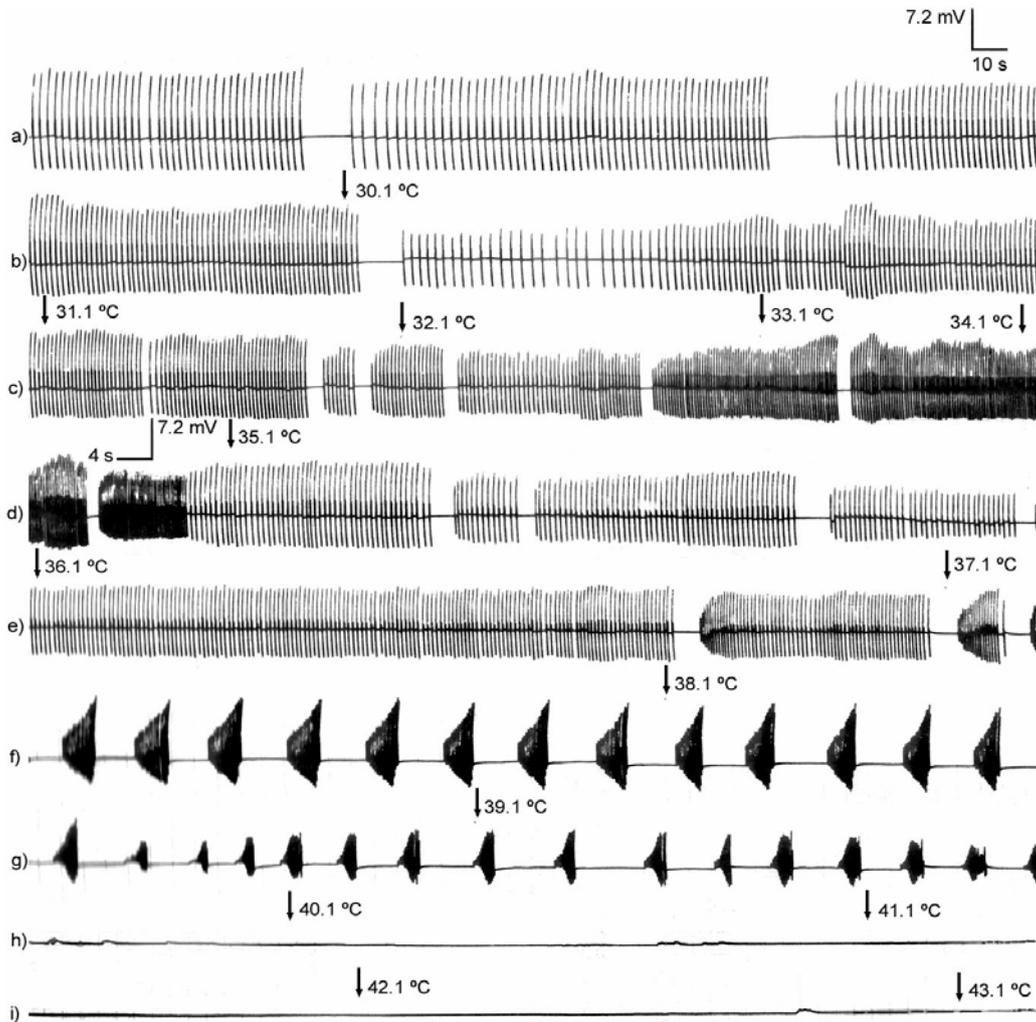
Iniciamos el estudio considerando solamente el efecto del incremento de la temperatura de la solución Ringer. En una segunda etapa incluimos la aplicación de campo magnético iniciando estos experimentos con descenso de la temperatura del Ringer. Para valores de temperaturas previamente escogidos se aplicó campo magnético. De la misma forma se procedió aumentando la temperatura. Nótese que las neuronas estudiadas han sido la F47 y F2, del tipo de las excitadas por campo magnético (aumento de la frecuencia de los potenciales con el campo magnético aplicado y que se explica en base a la apertura de canales de calcio activados por  $\text{Ca}^{2+}$ ).

En la Fig. 4.47 se muestra la actividad de la neurona F47 del ganglio parietal derecho bajo variación creciente de la temperatura en el rango de 30.1 °C a 43.1 °C. Para 33.1 °C se observa un brusco incremento en la frecuencia de disparo de los potenciales bioeléctricos. Para 37.1 °C la actividad neuronal se caracteriza por ráfagas con incrementos simultáneos de frecuencia y amplitud. Para 40.1 °C la neurona es completamente inhibida. Se observa como la transición que comienza a  $T_{f_1} \approx 33.1$  °C termina en  $\approx 35.1$  °C, mientras que la que comienza en  $T_{f_2} \approx 37.1$  °C desaparece en  $\approx 40$  °C.

El aumento de la frecuencia durante las transiciones de fase debe corresponderse a modificaciones de las estructuras del cristal líquido tales que se produzca un incremento de los iones de calcio libres en el citosol, de acuerdo con el modelo dMA, expuesto en la sección 5.

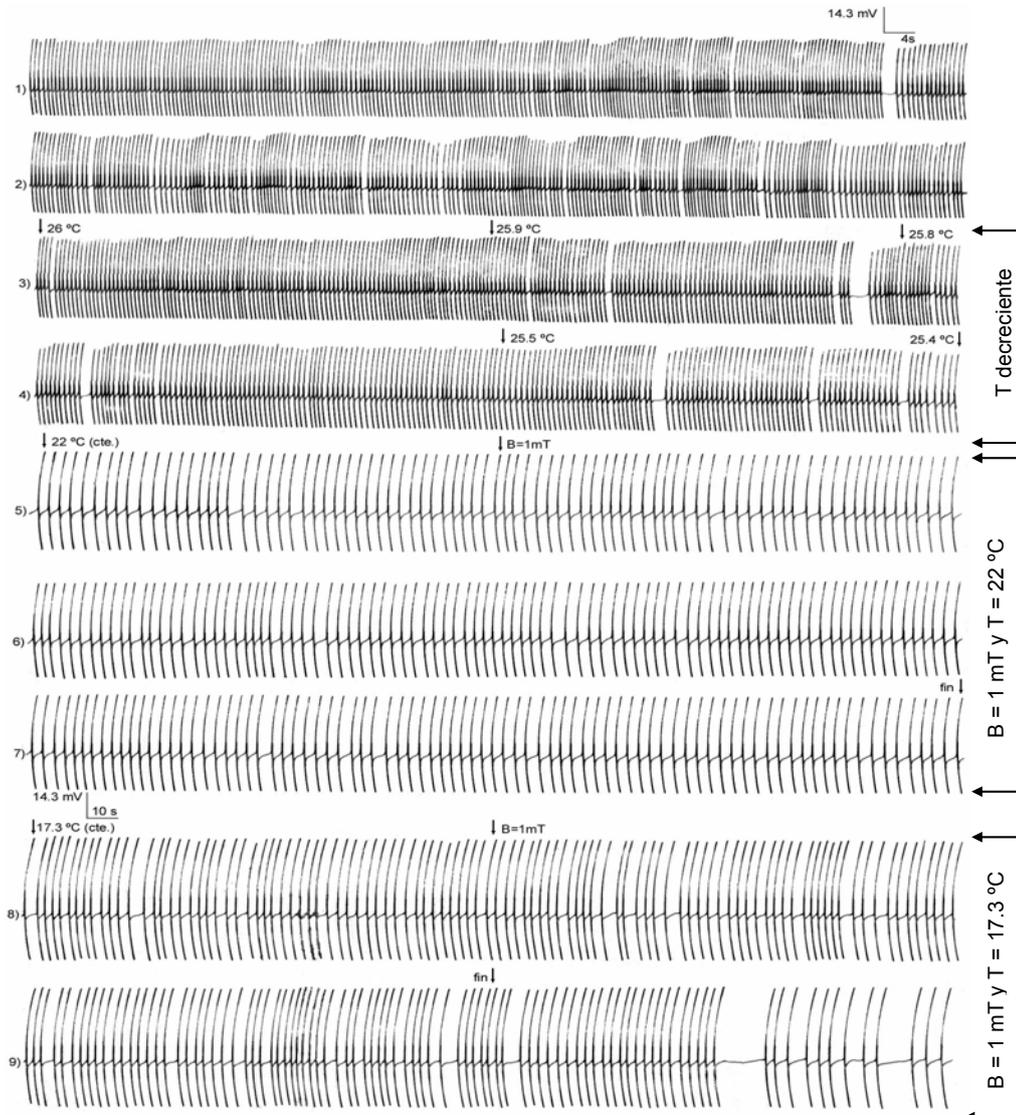
En la Fig. 4.48 se muestra la actividad electrofisiológica de la neurona F2 del ganglio parietal derecho bajo el efecto de la disminución de la T solamente (registros 1 - 4) y luego combinada con un CME de intensidad 1 mT, aplicado durante 5 min. (registros 5 - 7). Con el descenso de la temperatura la frecuencia de los potenciales disminuye. Cuando se aplica campo magnético, a una temperatura constante de 22 °C, se observa un ligero incremento en la frecuencia de los potenciales (registros 5 - 7), sin embargo para 17.3 °C no se registran cambios significativos (registros 8 - 9). Al aumentar a continuación la temperatura, a partir del registro 10, se observa un incremento en la frecuencia de los potenciales. Para valores constantes de temperatura de 23 y 29.5 °C y campo magnético de 1 mT se observan incrementos de frecuencia superiores a los medidos en ausencia de CM (registros 10 - 11 y 17 - 19). En ausencia de CM (registro 20) la frecuencia de la neurona disminuye temporalmente, y se recupera cuando aumenta T (a partir del registro 21). Se observan importantes cambios en el tipo de actividad electrofisiológica (registros 22 - 27). Para  $T_{f_1} \approx 31^\circ\text{C}$   $T_{f_2} \approx 38.5^\circ\text{C}$  obtenemos los mismos patrones de respuesta que para los registros correspondientes a las temperaturas entre 37.1 y 39.1 °C del experimento de la Fig. 4.47.

La principal conclusión de los experimentos preliminares sobre el efecto de la temperatura de la membrana en la frecuencia de disparo de la neurona, es que el aumento de T “mimetiza” el efecto del CME, en ambos casos con un incremento de la frecuencia neuronal. En efecto, el aumento de la amplitud de las fluctuaciones térmicas de los PP por efecto de la energía térmica ( $\frac{1}{2} \kappa_B T$  por grado de rotación molecular), aumenta la probabilidad de liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  desde los radicales PP, incrementa la concentración citosólica de calcio activando los canales de calcio, mediante su propio mecanismo. Este efecto térmico refuerza la idea de que el campo magnético libera calcio desde la membrana.



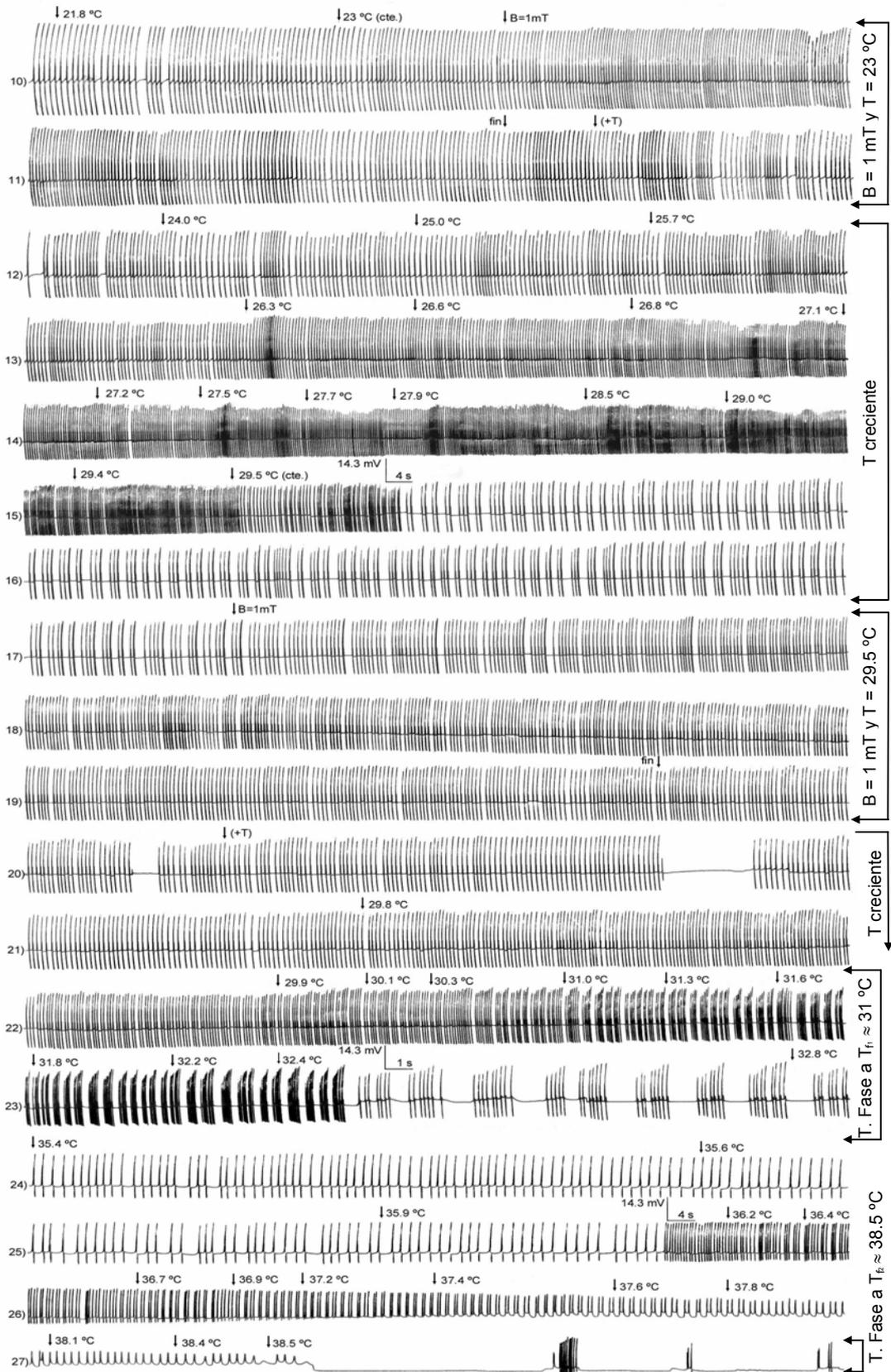
**Figura 4.47.-** Neurona F47. Incremento creciente de la temperatura (30.1 - 43.1 °C). Registros a) actividad espontánea,  $f_0 \approx 0.5$  pot./s. Se observan inhibiciones de larga duración. Registro b) disminución de frecuencia y amplitud una vez iniciado el aumento de la temperatura. Registro (c - e) para 33.1 °C se observa un incremento brusco en la frecuencia de disparo de los potenciales con cambios morfológicos poco relevantes. Registros (e - f) para 37.1 °C se observan cambios en el tipo de actividad neuronal, produciéndose ráfagas con frecuencia y amplitud creciente de forma simultánea. Registro g) disminución de amplitud y frecuencia de los potenciales. Registros (h - i) la neurona es completamente inhibida. Los registros son continuos. La duración del experimento fue de 28 minutos.

RESULTADOS



**Figura 4.48.-** Neurona F2. Combinación de T con CME de 1 mT aplicado durante 5 min. Descenso de T (26 - 17.3 °C) y luego aumento hasta 38.5 °C. Registros (1 - 2) actividad espontánea,  $f_0 \approx 1.5$  pot./s. Registros (3 - 4) disminución de f con descenso de T. Registros (5 - 7), T cte. e igual a 22 °C y B = 1 mT, ligero aumento de f (neurona excitada por CM). Registros (8 - 9), T cte. igual a 17.3 °C y 1 mT, no se observan cambios significativos. Registros (10 - 11), T cte. igual a 23 °C y 1 mT, incrementos de frecuencia superiores a los medidos en ausencia de CM. Registros (12 - 16) continua aumentando f con el incremento de T. Registros (17 - 19), T cte. igual a 29.5 °C y B = 1 mT, incrementos de frecuencia superiores a los medidos en ausencia de CM. Registro 20) al retirar el CM se observa una disminución temporal de f, que se recupera cuando continua el incremento de T (registro 21). Registros (22 - 27) para T de 31 °C actividad caracterizada por ráfagas con incrementos bruscos en frecuencia y amplitud, situación que se repite para 38.5 °C, nuevamente correspondiente a la transición de fase observada en la membrana de la neurona F47 de la Fig. 4.46. Los registros no son continuos. La duración del experimento fue de 74 minutos.

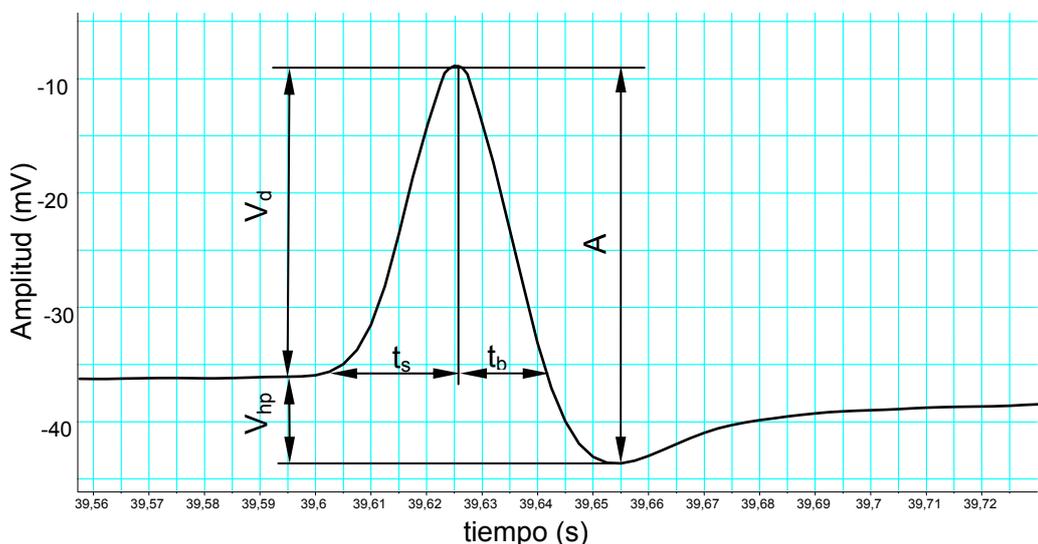
RESULTADOS



## 4.5.- ESTUDIO DE LA MORFOLOGÍA DE LOS POTENCIALES

### 4.5.1.- MORFOLOGÍA DE LOS POTENCIALES

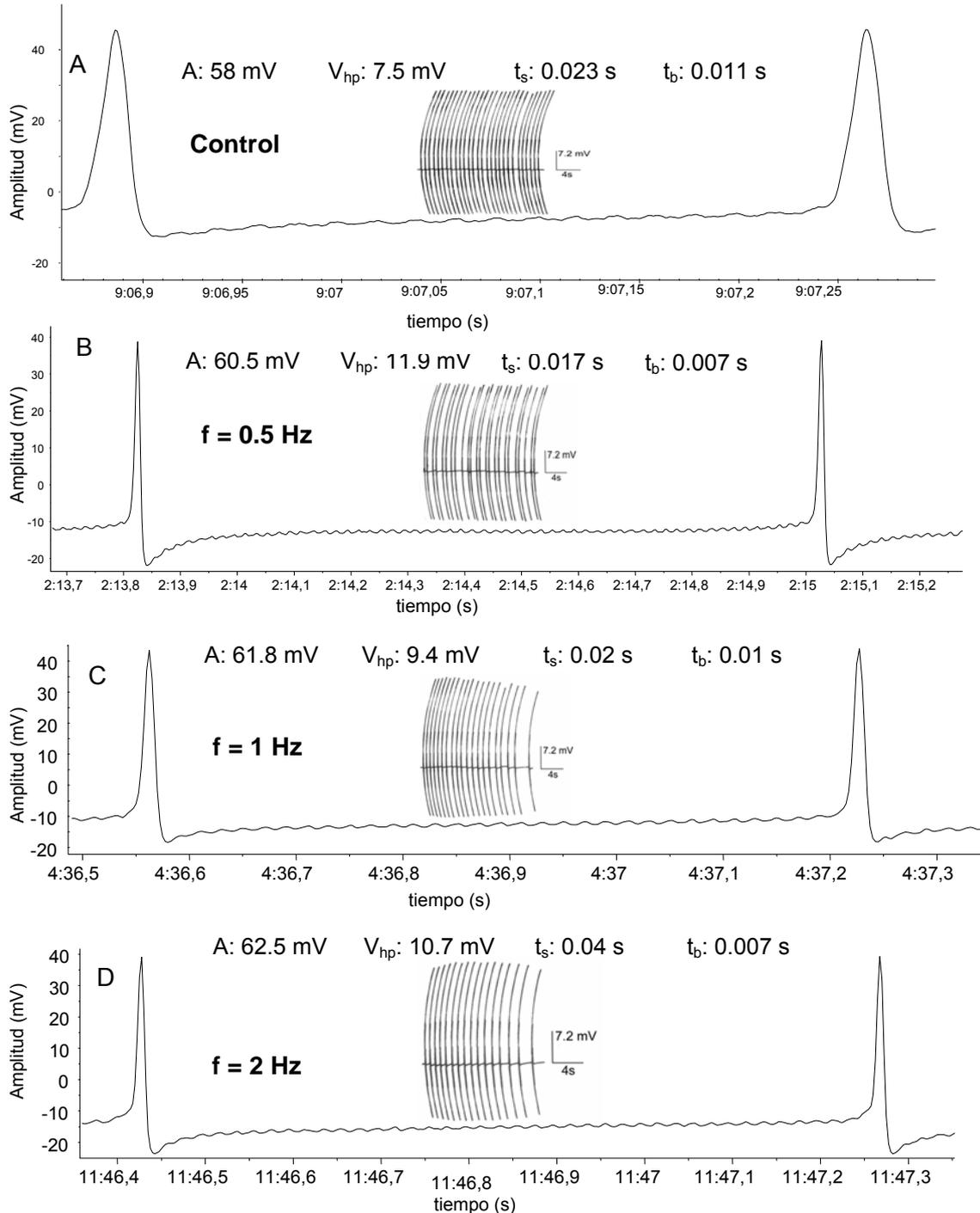
Con el objetivo de determinar si el campo alterno produce algún efecto en la morfología de los potenciales bioeléctricos se estudian los diferentes parámetros que lo caracterizan: amplitud ( $A$ ), voltaje de despolarización ( $V_d$ ), voltaje de hiperpolarización ( $V_{hp}$ ) y tiempos de subida ( $t_s$ ) y de bajada ( $t_b$ ) antes y después de la exposición al campo magnético. En la Fig. 4.49 se muestra un potencial de acción de la neurona V14 de *Helix aspersa* donde se señalan cada uno de los parámetros estudiados.



**Figura 4.49.-** Potencial de acción de la neurona V14 de *Helix aspersa*. A: amplitud.  $V_d$ : voltaje de despolarización.  $V_{hp}$ : voltaje de hiperpolarización.  $t_s$ : tiempo de subida.  $t_b$ : tiempo de bajada.

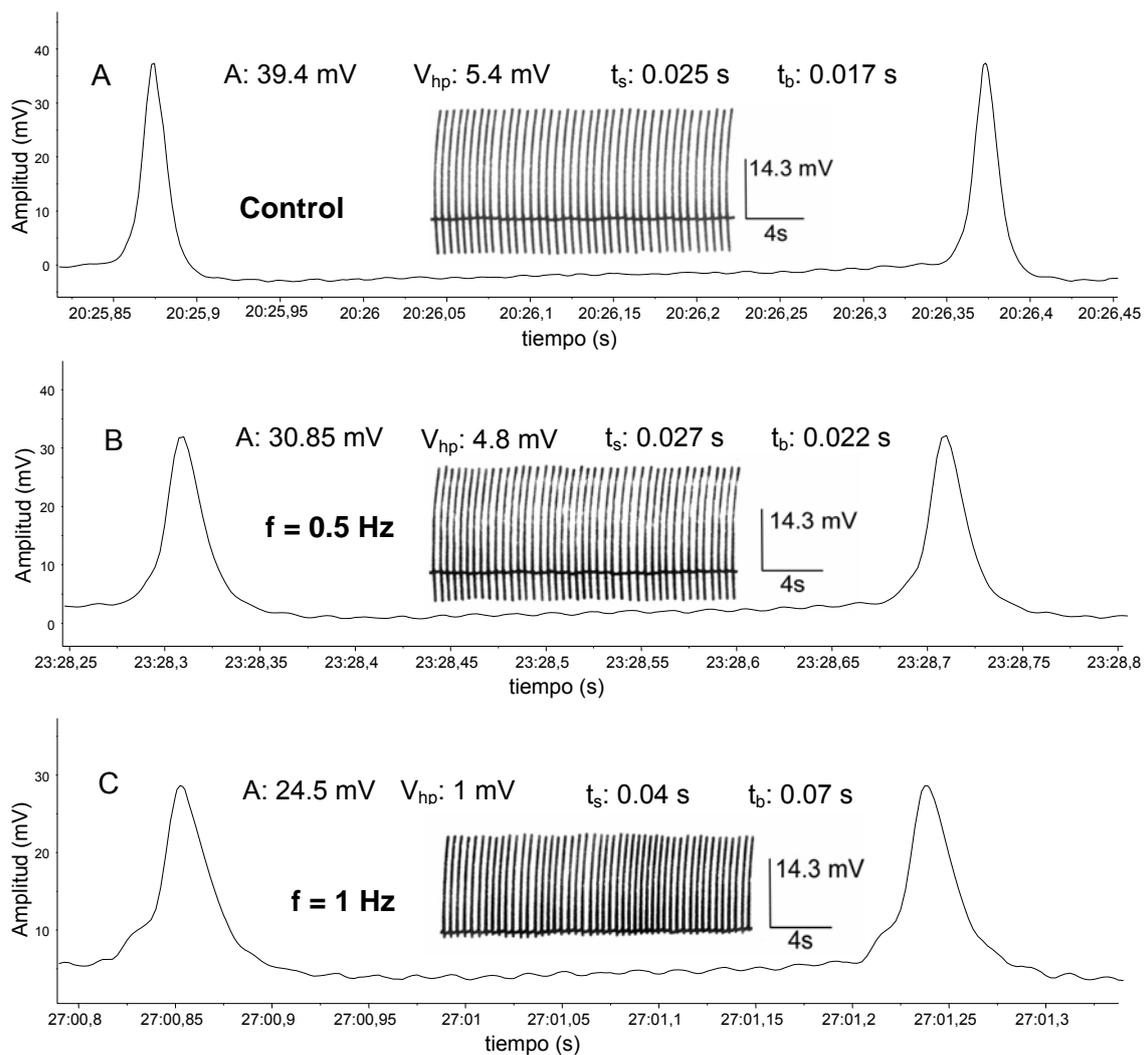
En la Fig. 4.50 se muestra la morfología de un par de potenciales consecutivos, y la porción de registro electrofisiológico, realizado con el registrador gráfico Washington 400MD2C (Palmer BioScience), de donde han sido tomados. Estos potenciales se corresponden con cambios de amplitud observados para diferentes valores de frecuencia del campo magnético aplicado. Se observa un ligero incremento de la amplitud (de 58 a 62.5 mV) con el aumento de la frecuencia del CMA y tendencia al aumento del potencial de hiperpolarización respecto al control A (actividad espontánea). Por otro lado el tiempo de subida experimenta pocos cambios: es más corto en B (0.5 Hz) y más largo en D (2 Hz). Asimismo el tiempo de bajada disminuye bruscamente para 0.5 Hz y 2 Hz.

RESULTADOS

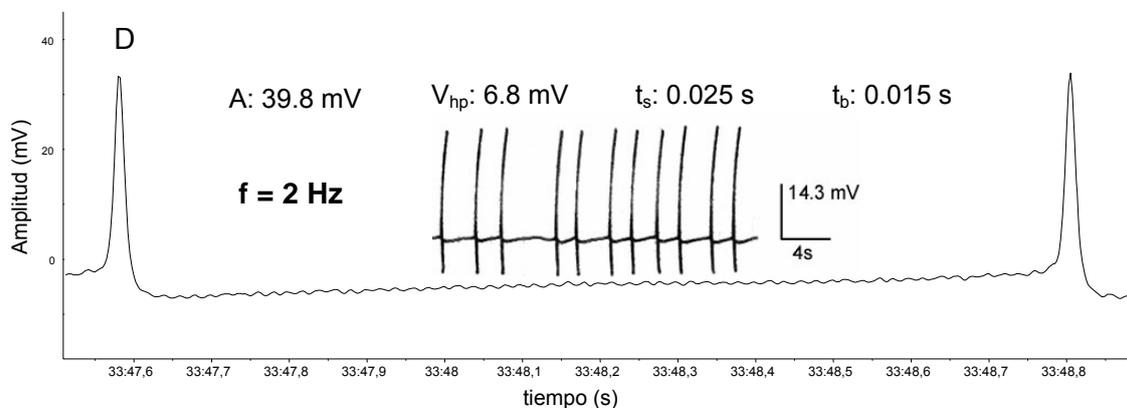


**Figura 4.50.-** Neurona F2 del ganglio parietal derecho. Se representa la amplitud de los potenciales, expresada en (mV), en función del tiempo, expresado en (s). A, actividad espontánea (ausencia de campo). Se aplicó un campo magnético de frecuencias 0.5 Hz (B), 1 Hz (C), y 2 Hz (D) e inducción magnética constante (1mT). A: amplitud.  $V_{hp}$ : voltaje de hiperpolarización.  $t_s$ : tiempo de subida.  $t_b$ : tiempo de bajada. Se muestra asimismo la porción del registro electrofisiológico de donde han sido tomados los dos potenciales consecutivos.

En la Fig. 4.51 se muestra la morfología de un par de potenciales consecutivos, y la porción de registro electrofisiológico, realizado con el registrador gráfico Washington 400MD2C (Palmer BioScience), de donde han sido tomados. Estos potenciales se corresponden con cambios de amplitud observados para diferentes valores de frecuencia del campo magnético aplicado. En B (0.5 Hz) y C (1 Hz) la amplitud de los potenciales disminuye y en D (2 Hz) se observa un incremento llegando a superar ligeramente el valor del control A (ausencia de campo). Con la aplicación del CM de frecuencia 0.5 Hz la hiperpolarización cambia ligeramente, para 1 Hz disminuye y para 2 Hz aumenta significativamente. Por otro parte, se observan ligeros cambios en el tiempo de subida y tiempo de bajada en B y D, siendo el aumento significativo en C.

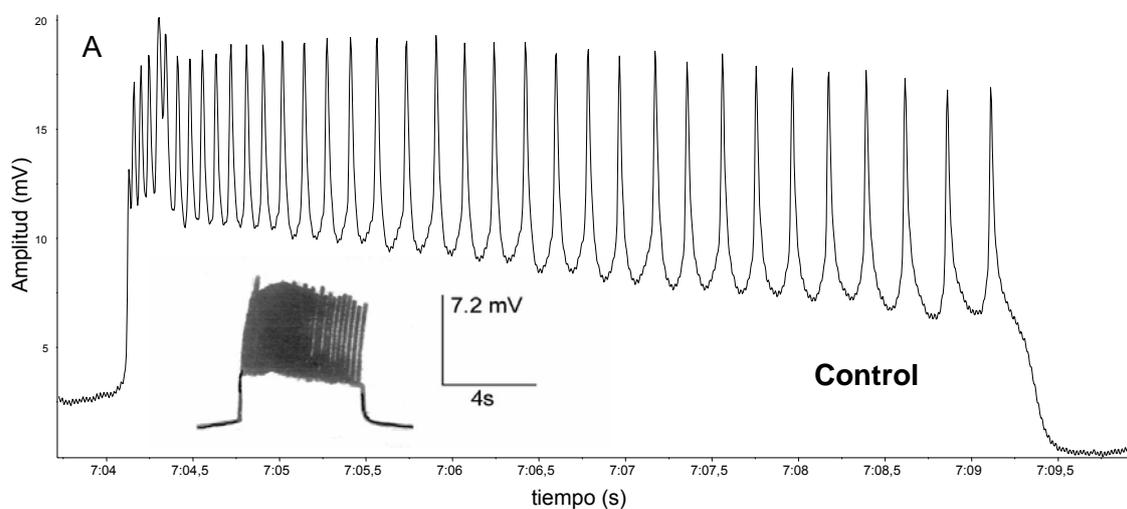


RESULTADOS

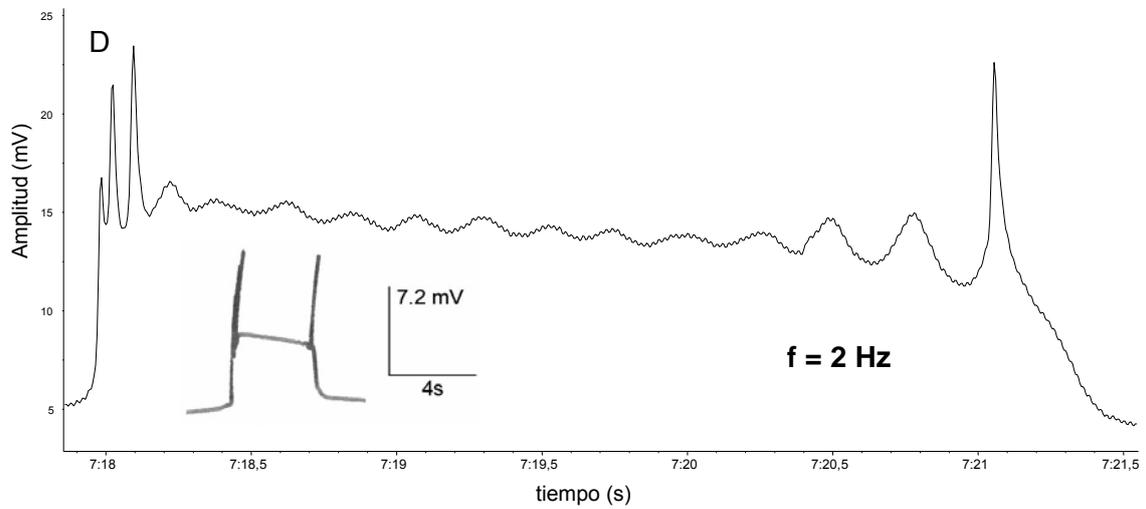
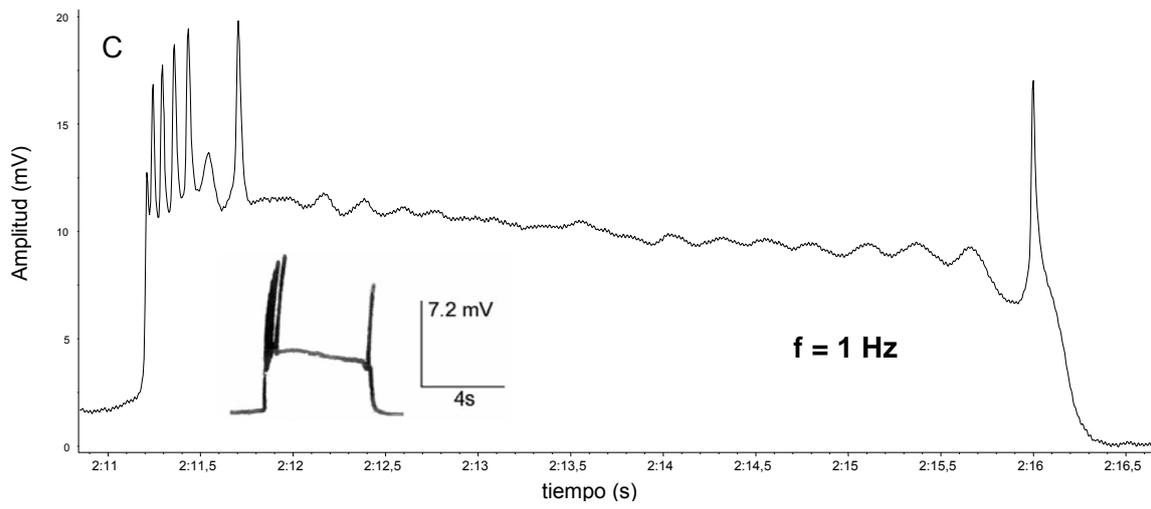
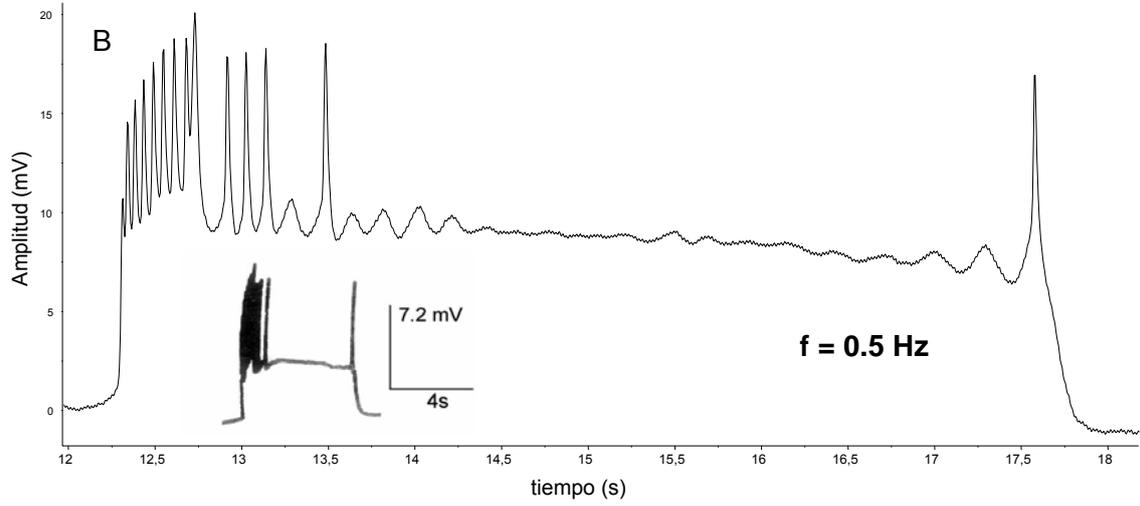


**Figura 4.51.-** Neurona V14 del ganglio visceral. Se representa la amplitud de los potenciales, expresada en (mV), en función del tiempo, expresado en (s). AE, actividad espontánea (ausencia de campo). Se aplicó un campo magnético de frecuencias 0.5 Hz (B), 1 Hz (C), y 2 Hz (D) e inducción magnética constante (1 mT). A: amplitud.  $V_{hp}$ : voltaje de hiperpolarización.  $t_s$ : tiempo de subida.  $t_b$ : tiempo de bajada. Se muestra asimismo la porción del registro electrofisiológico de donde han sido tomados los dos potenciales consecutivos.

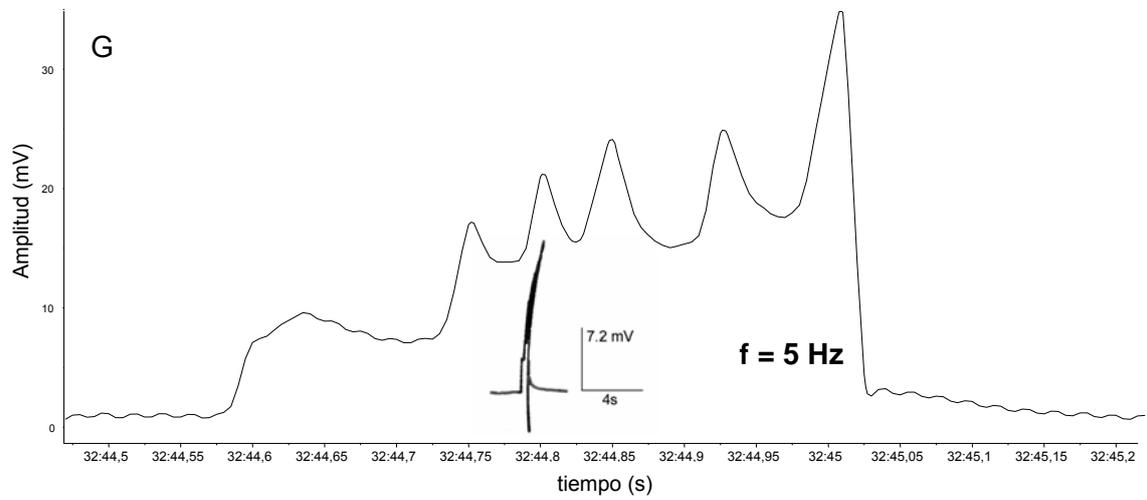
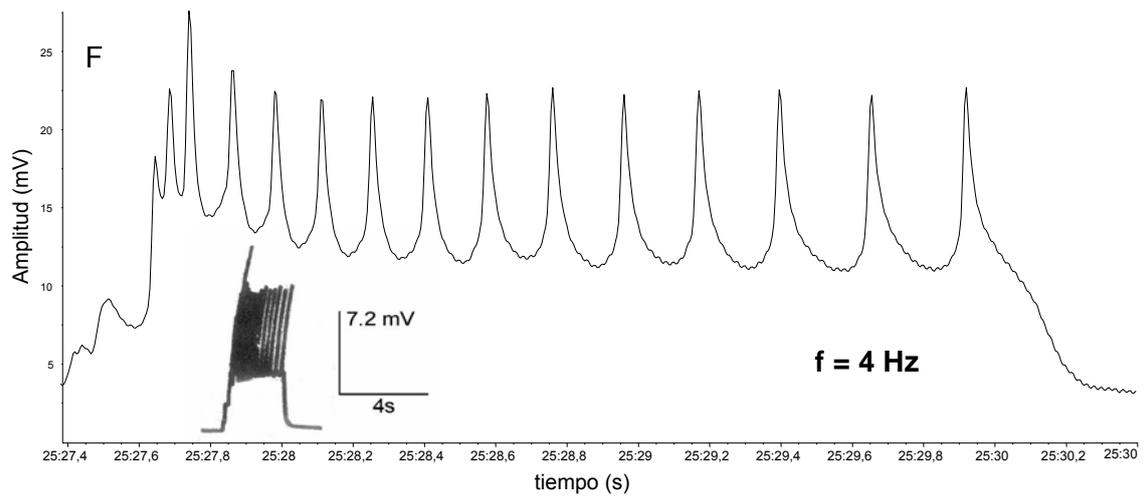
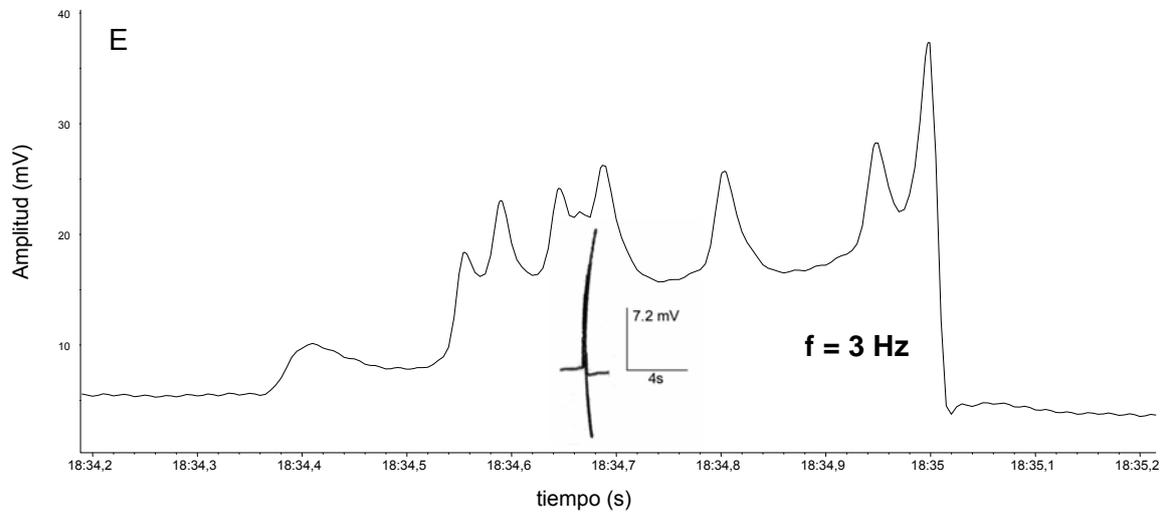
En la Fig. 4.52 se muestra la morfología de una ráfaga de potenciales consecutivos, y la porción de registro electrofisiológico, realizado con el registrador gráfico Washington 400MD2C (Palmer BioScience) correspondiente, que se corresponden con cambios observados para diferentes valores de frecuencia del campo magnético aplicado.

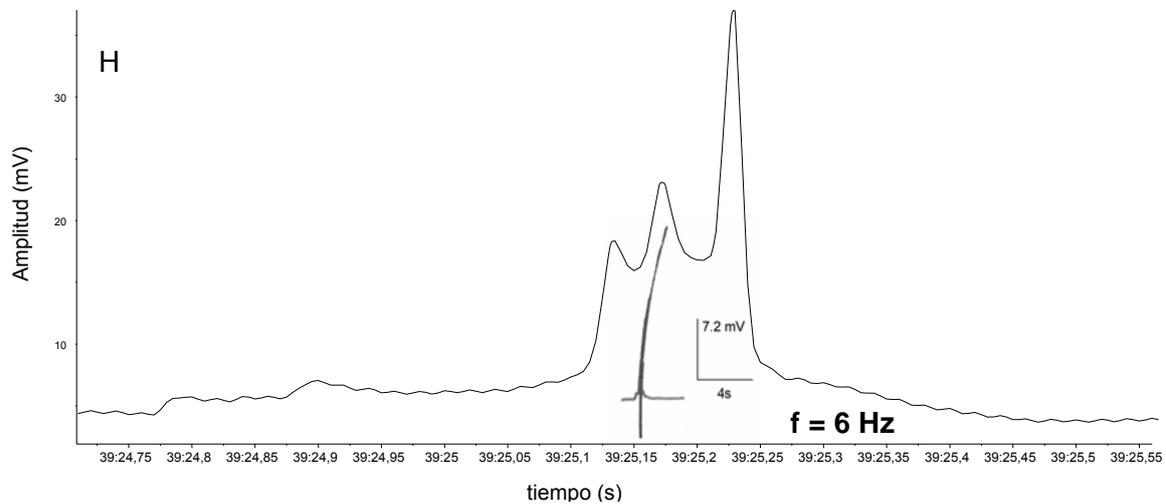


RESULTADOS



RESULTADOS





**Figura 4.52.-** Neurona D5 del ganglio parietal izquierdo. Se representa la amplitud de los potenciales, expresada en (mV), en función del tiempo, expresado en (s). A, actividad espontánea (ausencia de campo). Se aplicó un campo magnético de frecuencias 0.5 Hz (B), 1 Hz (C), 2 Hz (D), 3 Hz (E), 4 Hz (F), 5 Hz (G) y H (6 Hz) e inducción magnética constante (1 mT).

La morfología que exhibe la neurona D5 es la típica de una neurona neurosecretora: despolarización producida por la entrada de iones de calcio, ráfaga de un cierto número de potenciales de amplitud típica definida por el potencial de equilibrio del calcio ( $V_{Ca}$ ) y marcada hiperpolarización debido a la salida de los iones de potasio por los canales específicos activados por el calcio intracelular. Desde el registro control (A) al obtenido bajo exposición a frecuencia de 6 Hz (H) se observan importantes modificaciones. El número de potenciales bioeléctricos disminuye notablemente en B (0.5 Hz), C (1 Hz) y D (2 Hz). En F (4 Hz) se recupera la actividad, en cierta medida, con una notable disminución de la frecuencia. En E (3 Hz), G (5 Hz) y H (6 Hz) se observa una disminución importante del tiempo de duración de la despolarización de aproximadamente 5s respecto al control (A). La alteración de los mecanismos iónicos subyacentes es notable con un aumento en la amplitud de la despolarización máxima de hasta 30 mV.

## 5.- MODELOS TEÓRICOS

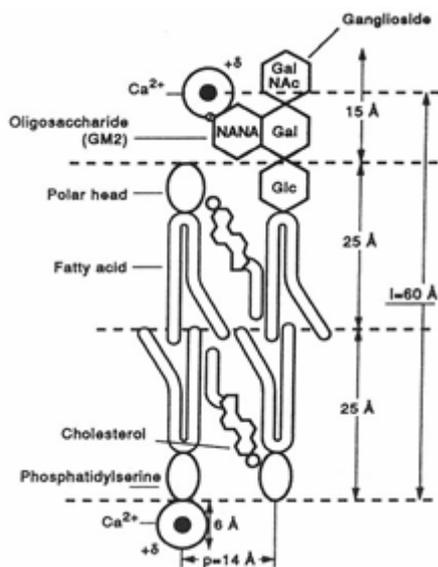
Se presentan a continuación diversos modelos físicos que explican la interacción de un campo electromagnético de frecuencia extremadamente baja (FEB) con la membrana de las neuronas (del Moral et al., 2006a y b). Para ello se generaliza la ecuación diferencial del impulso bioeléctrico de Hodgkin-Huxley (HH) (Hodgkin y Huxley, 1952) con la corriente citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  generada por el campo de FEB aplicado denominado aquí (modelo 1) (del Moral y Azanza 1992; del Moral et al., 2002). Asimismo se considera en el modelo de superdiamagnetismo y explosión coulombiana (modelo dMA, del Moral y Azanza, 1992) que el campo magnético es alterno (del Moral et al., 2002). Se obtienen, el espectro de frecuencia y la dependencia temporal y con la frecuencia, del voltaje de repolarización-hiperpolarización espontáneo y bajo CM de FEB (modelo 2). Se obtiene la función que describe el comportamiento de la frecuencia de disparo de la neurona en función de la frecuencia del campo magnético aplicado (modelo 3). Finalmente, se obtiene la evolución temporal del voltaje de despolarización y se sugiere su independencia del CM de FEB aplicado (modelo 4).

Antes de pasar al desarrollo de estos modelos, y con el objeto de introducir algunos conceptos que serán usados más adelante, resumimos las ideas fundamentales del modelo físico propuesto en 1992 por A. del Moral y M. J. Azanza (modelo dMA). El modelo está basado en tres hipótesis esenciales: 1) la fuerte anisotropía diamagnética de los fosfolípidos de la membrana (PP) y de las proteínas-bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-asa}$ ; 2) el fenómeno del superdiamagnetismo por el cual los PP actúan cooperativamente formando grandes dominios o clústeres correlacionados, dentro del cristal líquido, que constituye la membrana, bien a través de la interacción cuadrupolar eléctrica para PP relativamente próximos de las membranas de glía que rodean a las neuronas y que se relacionan por uniones de calcio a través del glicocáliz, o de los PP de neuronas adyacentes unidas por conexinas (uniones gap) cuando la interacción sobrepasa los límites de la propia membrana (Azanza et al., 2005a); 3) los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  enlazados a los PP, a ambos lados de la membrana, son susceptibles de liberarse cuando las moléculas de  $\text{PP-Ca}^{2+}$ , situadas como vecinos más próximos (NN), rotan bajo la acción del campo magnético aplicado, liberándose los  $\text{Ca}^{2+}$  debido a su repulsión coulombiana a ambos lados de la membrana, mecanismo denominado

*explosión coulombiana*, dado que la liberación es simultánea en todo el clúster.

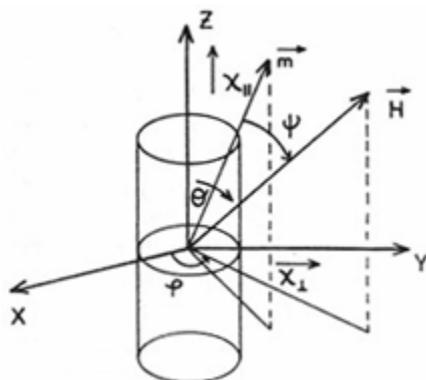
Como consecuencia del incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol, se activan los canales iónicos en la membrana plasmática, responsables de las modificaciones observadas en la actividad bioeléctrica neuronal: estimulación (por activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y/o disminución de la frecuencia de la neurona (por activación de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular).

Los PP mayoritarios de la membrana cargados negativamente (-e) en sus extremos polares son la fosfatidilserina (PS, exclusiva de la hemicapa citosólica) y los glicolípidos de la hemicapa extracelular (se han considerado los gangliósidos, GL). Enlazados a ambos tipos de moléculas, hay iones de  $\text{Ca}^{2+}$  solvatados, y el conjunto de “cabezas” cargadas presenta una carga positiva efectiva,  $+\delta_{ef}$  (Fig. 5.1). En  $+\delta_{ef}$  también influye la carga imagen formada en el dieléctrico de la membrana. Este efecto reduce fuertemente la carga efectiva de los iones de calcio enlazados a las moléculas de PS y GL, a  $\delta_{ef} \approx 0.053e$  (Azanza y del Moral, 1993).



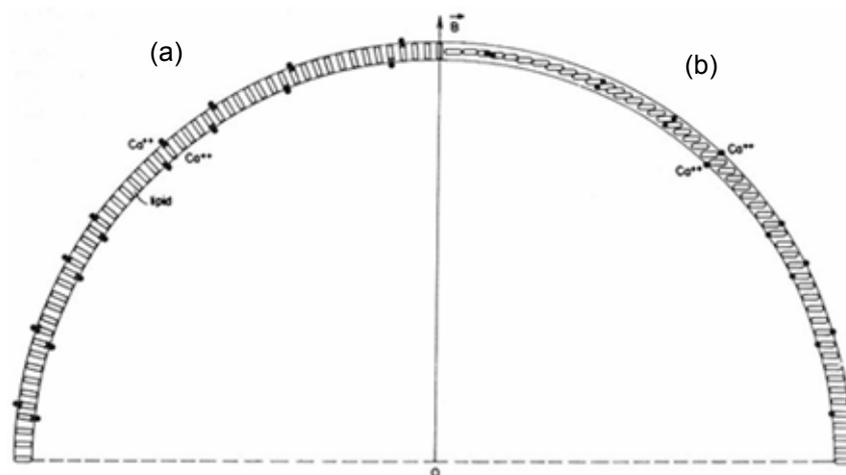
**Figura 5.1.-** Modelo de membrana de la neurona, mostrando las moléculas de fosfatidilserina (PS) y el gangliósido GM2 dispuestos como vecinos más próximos (en adelante NN). Las “cabezas” de ambas moléculas están cargadas negativamente (modificado de Alberts et al., 2002). Enlazados a las cabezas hay iones de  $\text{Ca}^{2+}$  solvatados, resultando una carga efectiva positiva,  $+\delta_{ef}$  (del Moral y Azanza, 1992).

Se considera que las neuronas tienen simetría esférica, situación aproximada a la realidad para las neuronas de *Helix aspersa* en solución Ringer (Fig. 3.2), si las células fueran elipsoidales la situación sería algo más complicada. Las moléculas de PP presentan fuerte *anisotropía diamagnética*, con una susceptibilidad magnética paralela al eje mayor del PP (supuesto un cilindro o un elipsoide),  $\chi_{\parallel}$ , diferente de la perpendicular,  $\chi_{\perp}$ , definiendo la anisotropía de la susceptibilidad como:  $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$  (Fig. 5.2).



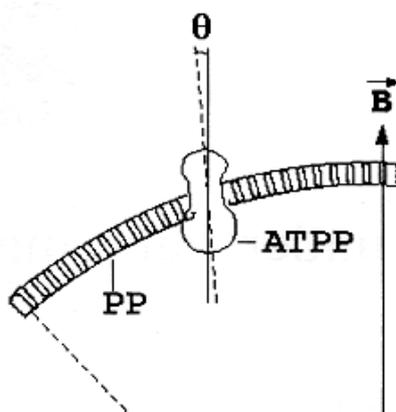
**Figura 5.2.-** Ángulo  $\theta$  formado por  $\mathbf{H}$  con el eje OZ, energía anisotrópica con simetría cilíndrica, para un PP con simetría cilíndrica (Azanza y del Moral, 1994).

Es de destacar que incluso un campo magnético intenso no es capaz de liberar iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde un PP individual y, por tanto, se hace necesaria la formación de clústeres o dominios de PP, es decir, la existencia de un estado *cooperativo* denominado *superdiamagnetismo*. Los PP no tienen momento dipolar *eléctrico* apreciable, por lo que la interacción entre PP se considera que es cuadrupolar eléctrica, tal y como sucede en los cristales líquidos esmécticos (Chaikin y Lubensky, 1995).



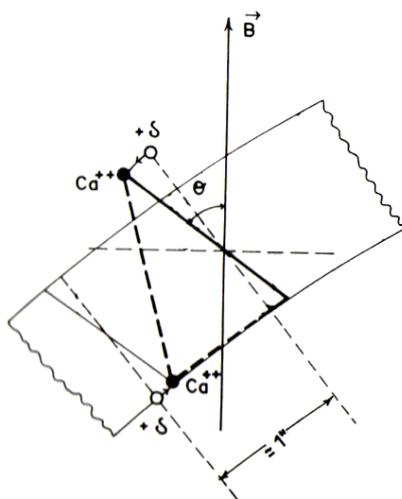
**Figura 5.3.-** (a) Representación esquemática (no a escala) del modelo de membrana neuronal, mostrando las moléculas de lípidos. Algunos NN, presentan iones de  $\text{Ca}^{2+}$  enlazados. Se muestran la dirección del CM aplicado **B**. (b) La misma membrana bajo el CM aplicado **B**. Los PP, por su anisotropía diamagnética han rotado completamente disponiendo sus ejes mayores ortogonales a **B** y las cabezas cargadas con  $\text{Ca}^{2+}$  se aproximan produciéndose la explosión coulombiana. Para los campos utilizados, en nuestros experimentos, los ángulos de rotación son mucho menores (del Moral y Azanza, 1992; Azanza y del Moral, 1994).

Cuando se aplica un campo magnético estático **B** a la neurona, dado que  $\Delta\chi < 0$  para los PP, éstos rotan alejándose de las líneas del campo **B** (Fig. 5.3) (del Moral y Azanza 1992; Azanza y del Moral, 1994). Para  $\Delta\chi > 0$ , situación que se cumple en el caso de las moléculas de proteínas de la membrana, la rotación es de sentido opuesto y las moléculas tratan de disponerse paralelas a **B** (Fig. 5.4) (Azanza y del Moral, 1995).



**Figura 5.4.-** Bicapa de PP de la neurona con una molécula de proteína bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-asa}$  (ATPP).  $\theta$  es el ángulo del eje mayor de la ATPP con el campo magnético **B** (Azanza y del Moral, 1996).

En la Fig. 5.5 se representa una posición intermedia de rotación de los PP. Si el campo magnético aplicado al clúster es suficientemente elevado, se puede alcanzar la orientación total de los conjuntos de fosfolípidos (caso presentado en la Fig. 5.3).



**Figura 5.5.-** Posición intermedia (arbitraria) de los dipolos magnéticos de los lípidos cargados NN, para el campo magnético aplicado. Los dipolos con carga (+ $\delta$ ) han rotado un ángulo  $\theta$  respecto a la dirección de aplicación del campo magnético.

Es fundamental, para que el proceso de liberación de calcio ocurra, que los PP cargados con  $\text{Ca}^{2+}$ , a *ambos* lados de la membrana, se encuentren dispuestos como *vecinos más próximos* (NN). El proceso de aproximación es posible ya que  $\delta_{\text{ef}}$  es relativamente pequeña como se ha indicado anteriormente. Por este mecanismo, los iones se liberarán como consecuencia de una *explosión coulombiana*, es decir simultánea, a ambos lados de la membrana.

En una neurona de *Helix aspersa*, con un soma neuronal de diámetro de  $\approx 100\ \mu\text{m}$ , situación próxima a la real, se puede estimar que el número de lípidos es de  $\approx 1.6 \times 10^{11}$  para la superficie total de la membrana. Para una liberación máxima de calcio de  $\approx 0.7\ \text{Ca}^{2+}/100$  lípidos, obtenemos una contribución a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre citosólico de  $\approx 2 \times 10^3\ \text{Ca}^{2+}/\mu\text{m}^3$ . Este resultado supone un incremento en un factor de 10 de la concentración normal (de menos de  $100\ \text{Ca}^{2+}/\mu\text{m}^3$ ) y, aproximadamente, del mismo orden de magnitud que la variación en la concentración de iones de calcio producida durante el potencial de disparo bioeléctrico en condiciones fisiológicas normales (Alberts et al., 2002).

La energía magnética de una macromolécula *diamagnética anisótropa* en un campo magnético aplicado de intensidad  $\mathbf{H}$  viene dada por

$$E_M = -(1/2)\mu_0 V H^2 (\chi_{\perp} + \Delta\chi \cos^2\theta), \quad (5.1)$$

donde  $\theta$  es el ángulo formado por  $\mathbf{H}$  con el eje OZ,  $V$  es el volumen de la molécula de PP o proteína. Esta energía tiene simetría cilíndrica (Fig. 5.2). De este modo el par magnético que reorienta a la molécula es  $|\mathbf{\Gamma}| = -\frac{\partial E_M}{\partial \theta} = |\mathbf{m} \times \mathbf{H}|$ , donde  $\mathbf{m}$  es el momento diamagnético inducido en la molécula.

Es claro a partir de la ecuación (5.1) que cuando  $\Delta\chi < 0$ , se alcanza el mínimo de energía para el eje de las moléculas dispuesto perpendicular a  $\mathbf{B}$ . Para  $\Delta\chi > 0$ , se alcanza el mínimo cuando el eje de las moléculas se dispone paralelo a  $\mathbf{B}$ . Estas son *las situaciones para los PP (Fig. 5.3) y para las proteínas de la membrana (Fig. 5.4)* respectivamente. Es de destacar la importancia de la geometría de las células con respecto a la dirección de aplicación del campo magnético.

El resultado más relevante del modelo es que se predice una variación de la frecuencia de disparo de la neurona con el campo magnético aplicado,  $\mathbf{B}$ , del tipo exponencial

$$f(\mathbf{B}) = f(0) \exp\left[-\frac{N_c |\chi_{\perp}| V}{2\mu_0 k_B T} B^2\right], \quad (5.2)$$

donde  $f(0)$  es la frecuencia de la actividad natural o espontánea;  $N_c$  es el número de fosfolípidos correlacionados en un clúster;  $T$  es la temperatura de la membrana ( $\approx 300\text{K}$  en nuestra situación experimental);  $V$  es el volumen de los PP considerados con forma de bastón ( $\approx 5 \times 10^{-28} \text{m}^3$ );  $\mu_0$  es la permeabilidad del vacío;  $\chi_{\perp} \approx -1.25 \times 10^{-7}$  (Azanza et al., 1993); y  $k_B$  es la constante de Boltzmann. Obtenemos así que la frecuencia de disparo de la neurona con un campo alterno aplicado debe ser de la forma

$$f(\mathbf{B}) = f(0) \exp(-\alpha B_0^2 \sin^2 \omega_m t), \quad (5.3)$$

donde

$$\alpha \equiv (N_C |\chi_{\perp}| V / 2\mu_0 k_B T), \quad (5.4)$$

parámetro que incluye las características físicas de la membrana y el efecto de la temperatura,  $T$ , como se ha dicho anteriormente.

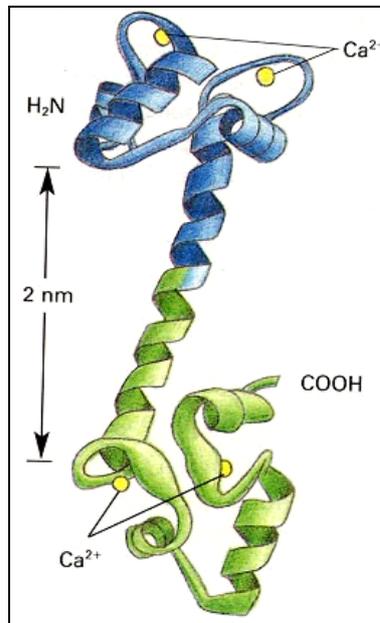
La función exponencial de la ecuación (5.3) expresa el proceso de la explosión coulombiana, a través de la rotación de los PP (superdiamagnetismo) y viene determinada por el factor de Boltzmann  $\exp(-E_d/k_B T)$ , a través de  $\alpha$ . Nótese que  $E_d$  es la energía diamagnética transversal de la molécula en el campo. Cuando el campo magnético aplicado es alterno, es decir de la forma  $B(t) = B_0 \sin \omega_M t$  la ec. (5.3) debe ser modificada, como veremos más adelante.

### 5.1.- MODELOS DEL EFECTO DE UN CAMPO MAGNÉTICO DE FRECUENCIA EXTREMADAMENTE BAJA CON MEMBRANAS NEURONALES

A continuación se presentan los modelos desarrollados (del Moral et al., 2006), que explican diversas de nuestras observaciones experimentales sobre los efectos de campos magnéticos de FEB sobre las neuronas de *Helix aspersa*, en concreto sobre el potencial bioeléctrico (espontáneo y bajo campo magnético) y su frecuencia. Como veremos estos modelos explican diversos fenómenos, desde puntos de vista diferentes, aunque complementarios, y constituyen una sólida alternativa al extendido modelo de la “resonancia estocástica” (Wellens et al., 2004). Su interés radica en que contrariamente a éste modelo esencialmente matemático y con discutibles conjeturas, poco probadas experimentalmente en neurofisiología, nuestros modelos tienen la ventaja de poseer un soporte físico a *nivel microscópico* y están basados en teorías físicas ampliamente aceptadas. En esencia nuestros modelos explican diversos hechos experimentales, en particular las observaciones de la variación de la frecuencia de disparo de la neurona con la del campo magnético aplicado (su amplitud y frecuencia), así como la morfología del impulso (repolarización e hiperpolarización, despolarización y la observación de que la forma del impulso bioeléctrico es débilmente influenciada por el campo alterno aplicado.

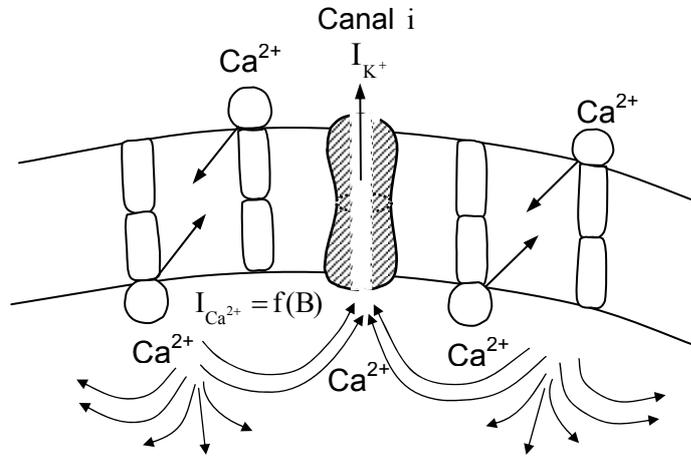
**5.1.1.- ECUACIÓN DE HODGKIN-HUXLEY (HH) SUPLEMENTADA POR CAMPO MAGNÉTICO (ECUACIÓN HHM) Y CÁLCULO DEL VOLTAJE TRANSMEMBRANA: DEPENDENCIA TEMPORAL Y ESPECTRO EN FRECUENCIA**

La nueva ecuación que hemos denominado HHM introduce una corriente interna (citoplasmática) de  $Ca^{2+}$  liberado por efecto del campo magnético aplicado,  $I_{Ca}(B)$ . Esta corriente es producida por la anisotropía diamagnética de los PP y la explosión coulombiana de  $Ca^{2+}$ , la cual abre los canales de  $K^+$ , al enlazarse el calcio con la molécula de calmodulina del canal (Fig. 5.6). Nótese el importante hecho de que son *cuatro* los iones de  $Ca^{2+}$  que se enlazan con la molécula de calmodulina.



**Figura 5.6.-** Estructura esquemática del complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, basada en estudios de difracción de rayos X. Cada una de las cabezas tiene dos dominios de unión al  $Ca^{2+}$ . Los dos lugares de unión al  $Ca^{2+}$  del extremo carboxilo terminal de la molécula tienen una afinidad por el  $Ca^{2+}$  diez veces superior a la del extremo amino terminal (Babu et al., 1985).

La corriente  $I_{Ca}(B)$  se suma a la espontánea expresada mediante la ecuación HH (Hodgkin y Huxley, 1952) a través de la membrana,  $I_{ext}$ , y da origen a una ecuación, para un canal  $i$  (Fig. 5.7), de acuerdo con el circuito eléctrico equivalente que proponemos para la membrana, en que esta se considera un nudo eléctrico efectivo (Fig. 5.8).

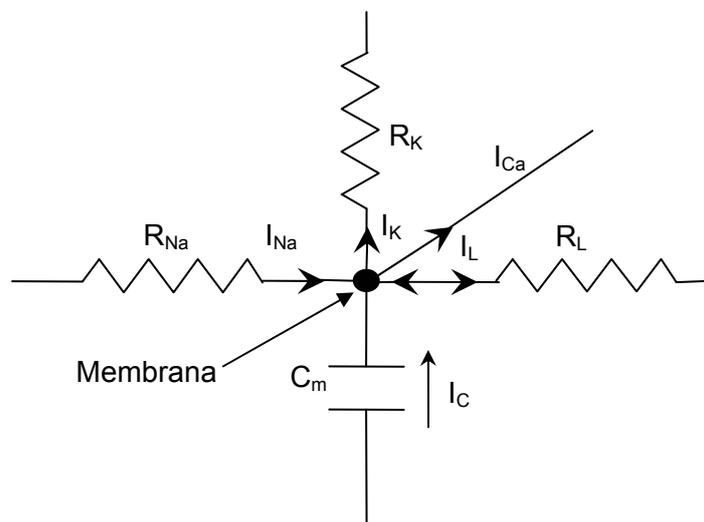


**Figura 5.7.-** Moléculas PP-Ca<sup>2+</sup> dispuestas como vecinos más próximos (NN). La rotación (↗) inducida por el campo magnético aproxima las cabezas de PP a las que se unen los Ca<sup>2+</sup>. Por repulsión coulombiana se suelta el Ca<sup>2+</sup>, que a continuación interacciona con el canal de K<sup>+</sup>, promoviendo la salida de este ión al medio extracelular (corriente de intensidad I<sub>K<sup>+</sup></sub>).

La ecuación propuesta es realmente la ley de nudos de Kirchoff en AC, en que  $\sum_r I_r = 0$ , donde r son las ramas que concurren en el nudo, la membrana en nuestro caso. Realmente, esto constituye una modificación substancial de la ecuación original de HH. Esta ecuación de la forma,

$$C_m (dV_i/dt) + g_{Na} (m_i^3 h_i) (V_i - V_{Na}) + g_K n_i^4 (V_i - V_K) + g_L (V_i - V_L) - I_{Ca}(B) = 0, \quad (5.5)$$

donde  $g_i$  ( $i = Na, K, L$ ) son las conductancias de los canales iónicos ( $i$  representa los canales de sodio, canales de potasio y canales de fuga, L) (ver Fig. 5.7). La adjudicación de los signos a las corrientes es meramente por conveniencia.



**Figura 5.8.** Circuito eléctrico equivalente de la membrana considerando que las diferentes ramas concurren en un mismo nudo, que en nuestro caso representa a la membrana. Nótese como se ha prescindido de los generadores de f.e.m. de Nerst,  $V_{Na}$  y  $V_K$  usualmente usados en el modelo HH.

El primer término es necesario dado que operamos con voltajes variables con el tiempo y por tanto deberemos introducir la corriente a través de la capacidad,  $C_m$  de la membrana (corriente de desplazamiento). El cuarto término es la corriente aleatoria de fuga (por canales abiertos en estado de reposo, en número pequeño). Todas pueden eliminarse menos la corriente de salida de  $K^+$ , ya que vamos a tratar ahora el proceso de repolarización-hiperpolarización (en el que no existen corrientes de sodio).  $V_{Na}$  y  $V_K$  son los potenciales de equilibrio termodinámico de Nernst (realmente f.e.m.) y  $V_i(t)$ , el potencial transmembrana para el canal  $i$  (hay  $N$  estructuras canal). Nótese que en nuestro modelo de nudos no es necesario añadir a las resistencias,  $R_{Na}$  y  $R_K$ , los generadores de f.e.m. de Nerst  $V_{Na}$  y  $V_K$  como se hace en el modelo HH convencional.  $I_{Ca}(B)$ , es la corriente interior de  $Ca^{2+}$  (citoplasmática, próxima a la superficie de la membrana, aunque la total se difunde por todo el citoplasma), debida al campo magnético (modelo dMA).  $m_i$  es proporcional a la densidad superficial (por unidad de área de membrana) de canales de  $Na^+$ ,  $h_i$  es proporcional a la densidad de “moléculas” inhibitoras (neurotransmisores) y  $n_i$  es proporcional a la densidad superficial de canales de  $K^+$  (nótese que  $q_i = C_m V_i$  e  $I_i = dq_i/dt$ , en la capacidad eléctrica de la membrana,  $C_m$ ). El segundo término es la corriente de sodio de

despolarización, producida por el propio voltaje de membrana. Por tanto nos queda, para el proceso de repolarización-hiperpolarización (rh),

$$C_m(dV_i/dt) = -g_K n_i^4 (V_i - V_K) + I_{Ca}(B). \quad (5.6)$$

Los experimentos indican que la frecuencia de disparo,  $\omega = 2\pi f$  *disminuye* con el aumento de la frecuencia del campo magnético aplicado,  $\omega_M$  en forma de una curva lorentziana, que es precisamente lo que nuestro modelo predice como veremos. Para ello supongamos que la velocidad de variación de canales inactivos hasta el tiempo  $t$ ,  $n_i(t)$  varía con el tiempo en la aproximación del tiempo de relajación, es decir,

$$\frac{dn_i}{dt} = -\frac{n_i(t)}{\tau_K(V_i)}, \quad (5.7)$$

donde  $\tau_K$  es el tiempo de relajación o de actuación de canales abiertos y  $n_i(t)$  el número de canales que permanecen cerrados al cabo de un tiempo  $t$ . Como en todo proceso de conducción (en nuestro caso por apertura de los canales PK) la aproximación del tiempo de relajación es la más sencilla que se puede hacer. Una aproximación "más allá de la del tiempo de relajación" sería muy complicada en nuestro caso, al no comprender aún completamente bien el mecanismo detallado de apertura de las proteínas canal por parte de los iones de calcio. No obstante esto queda como un tema teórico abierto en nuestra Memoria. La integral de ec. (5.7) es inmediatamente,

$$n_i(t) = n_0 \exp(-t/\tau_K) \quad (5.7')$$

donde  $n_0$  es proporcional a la densidad de canales inicialmente cerrados (físicamente cerrados y que se van abriendo, con lo que  $n_i$  va disminuyendo al aumentar el tiempo. Igualmente podríamos haber establecido que,

$$\frac{dn_i}{dt} = -\frac{n_i(t) - n_0}{\tau_K}, \quad (5.8)$$

donde  $n_i(t)$  son ahora el número de canales abiertos al cabo de un tiempo  $t$ , y  $n_0$  el número total de canales. La integración de (5.8) da entonces,

$$n_i(t) = n_0(1 - e^{-t/\tau}), \quad (5.8')$$

que es la función usualmente usada en la literatura. Por tanto de las ecs. (5.6) y (5.7') obtenemos que (llamamos ahora por simplicidad  $\tau_K = \tau$ ),

$$C_m(dV_i / dt) = -g_K(n_0 e^{-t/\tau})^4(V_i - V_K) + I_{Ca}(B), \quad (5.9)$$

ecuación diferencial del potencial de membrana. Integrándola obtenemos

$$C_m \int \frac{dV_i}{V_i - V_K} = \int_0^t -g_K(n_0 e^{-t/\tau})^4 dt + \int I_{Ca}(B) \frac{1}{(V_i - V_K)} dt \quad (5.10)$$

de donde,

$$C_m \ln \frac{V_i - V_K}{V_{i0} - V_K} = \int_0^t -g_K(n_0 e^{-t/\tau})^4 dt + \int I_{Ca}(B) \frac{1}{(V_i - V_K)} dt, \quad (5.11)$$

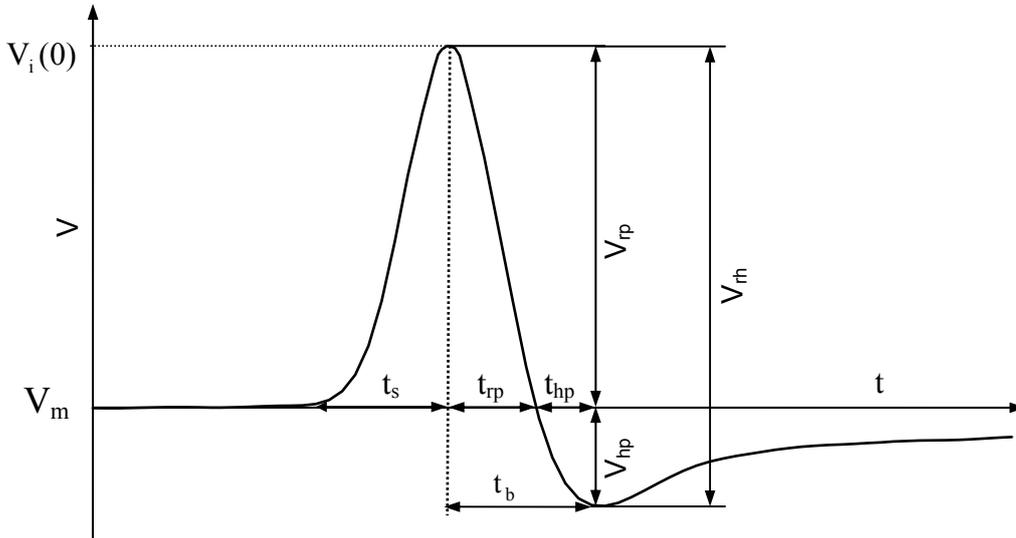
y por tanto,

$$\frac{V_i(t) - V_K}{V_{Na} - V_K} = \exp \left[ \int_0^t -\frac{g_K}{C_m} (n_0 e^{-t/\tau})^4 dt + \int I_{Ca}(B) \frac{1}{(V_i - V_K)} dt \right]. \quad (5.12)$$

La distribución lorentziana para el espectro de frecuencias del impulso bioeléctrico se obtiene ahora calculando el espectro en frecuencia de  $V_i(t)$  espontáneo. Para  $t \gg \tau$  ( $\tau \approx 10$  ms.) podemos desarrollar en serie la primera exponencial de ec. (5.12), y obtenemos así que

$$\frac{V_i(t) - V_K}{V_{Na} - V_K} \approx \left[ 1 - \frac{g_K n_0^4 \tau}{4C_m} \left( 1 - e^{-\frac{4t}{\tau}} \right) \right], \quad (5.13)$$

que nos proporciona la variación temporal de la parte del potencial de acción correspondiente al voltaje de repolarización-hiperpolarización ( $V_{rh}$ );  $V_{i0} \equiv V_i(0)$  (Fig. 5.9).



**Figura 5.9.-** Evolución temporal de un potencial de acción, donde se señala el voltaje de repolarización-hiperpolarización,  $V_{rh}$ .  $V_m$ : potencial de membrana en reposo.  $V_i(0)$ : voltaje final de despolarización o  $V_{Na}$ .  $t_b$ : tiempo de repolarización-hiperpolarización.

Esta *no* es la variación “sigmoideal”  $(1 - \exp(-t/\tau))^4$ , usualmente citada para el  $V_{rh}$  (Tritsch et al., 1998), dado que no se considera usualmente la corriente a través de la capacidad de la membrana,  $C_m$ . Ahora bien si utilizamos la ec. (5.7’), la ec. (5.12) para la hiperpolarización espontánea se transforma en,

$$\frac{V_i(t) - V_K}{V_{Na} - V_K} = \exp \left[ \int_0^t -\frac{g_K}{C_m} (1 - e^{-t/\tau})^4 dt \right], \quad (5.13')$$

y haciendo nuevamente el desarrollo en serie de la primera exponencial resulta,

$$\frac{V_i(t) - V_K}{V_{Na} - V_K} = 1 + \frac{g_K}{C_m} \int_0^t (1 - e^{-t/\tau})^4 dt, \quad (5.13'')$$

de donde,

$$V_i(t) = V_{Na} + (V_{Na} - V_K) \frac{g_K}{C_m} \int_0^t (1 - e^{-t/\tau})^4 dt, \quad (5.13''')$$

que no es precisamente la función  $(1 - e^{-t/\tau})^4$ , sino una más compleja, aún cuando la integración es inmediata. De ningún modo obtenemos la variación sigmoideal para  $V_i(t)$  en el proceso de repolarización más hiperpolarización.

Notar que la corriente espontánea a través del canal de  $K^+$  es a partir de ec. (5.13),

$$I_K = g_K V_i = g_K V_K + g_K (V_{Na} - V_K) \left[ 1 - \frac{g_K n_0^4 \tau}{4C_m} \left( 1 - e^{-\frac{4t}{\tau}} \right) \right], \quad (5.13''')$$

que tampoco es una función sigmoideal (este punto lo discutiremos en la sección 6). Tomaremos ahora la transformada de Fourier de  $V_i(t)$  (densidad espectral del voltaje), tomando como origen de frecuencias una característica de la membrana,  $\omega_0^*$ , en el proceso considerado. De este modo de ec. (5.13') obtenemos,

$$V_i(\omega) = g_K V_K + g_K (V_{Na} - V_K) \left[ \left( 1 - \frac{g_K n_0^4 \tau}{4C_m} \right) \delta(\omega - \omega_0^*) + \left( \frac{g_K n_0^4 \tau}{4C_m} \right) \int e^{i(\omega - \omega_0^*)t} e^{-4t/\tau} dt \right] \quad (5.14)$$

donde  $\delta(\omega - \omega_0^*)$  es la delta de Dirac, centrada en  $\omega = \omega_0^*$ , que es un artefacto del cálculo, debido al desarrollo en serie efectuado al obtener la ec. (5.13), y que por tanto no consideraremos. Ahora bien la transformada de Fourier de  $\exp(-4t/\tau)$  es una *lorentziana*, por lo que el espectro de frecuencias de disparo espontáneo de los canales de  $K^+$  es, (exceptuando  $\delta(\omega - \omega_0^*)$ ),

$$V(\omega) = \frac{A^*}{(\omega - \omega_0^*)^2 + (\Delta\omega/2)^2}, \quad (5.15)$$

donde  $A^* = \frac{g_K^2 n_0^4 \tau}{4C_m}$  y la anchura de la lorentziana es  $\Delta\omega = 4/\tau$ , claramente relacionada

con el tiempo de relajación del canal de  $K^+$ . Nótese que esta distribución lorentziana es la correspondiente a un solo potencial de disparo, y no la correspondiente a la frecuencia de disparo de la neurona. Este resultado constituye otro modo de describir, en el dominio de frecuencias, la forma del  $V_{rh}$  (ver Fig. 5.10).



frecuencia del campo,  $\omega_M$  una distribución existente en la membrana de “estructuras” PP + PK con una distribución de frecuencias de disparo diferentes, que “resuenan” con el campo, es decir hemos hecho  $\omega_0^* = \omega_M$ . Vamos a hacer ahora una hipótesis *diferente* y es que el CMA  $B = B_0 \text{sen}(\omega_M t)$  da origen para *toda* la membrana a un espectro lorentziano en  $\omega_M$ , lo cual vamos a probar. Sabemos que según el modelo dMA la frecuencia de disparo de la neurona bajo CMA es de la forma de la ec. (5.3), es decir,

$$\omega(t) = \omega_0 \exp\left(-\alpha (B_0 \text{sen } \omega_M t)^2\right), \quad (5.16)$$

variación complicada que en absoluto se observa experimentalmente. Esto es así por lo siguiente. La densidad de energía magnética almacenada en la membrana, aunque no disipada si despreciamos pérdidas óhmicas y dieléctricas, es de la forma

$$e_M(t) = (B_0^2/2\mu_m) \text{sen}^2 \omega_M t = \frac{B^2(t)}{2\mu_m}, \quad (5.17)$$

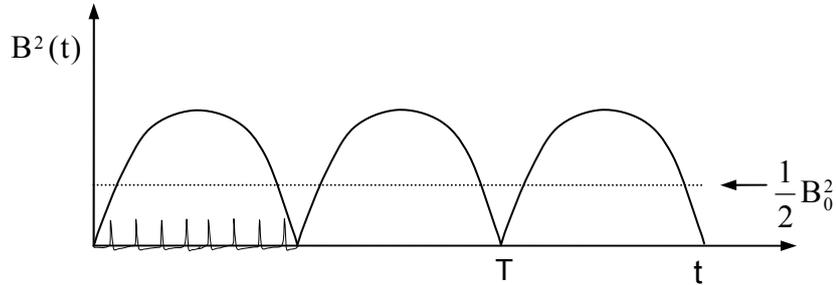
donde  $\mu_m$  es la permeabilidad magnética de la membrana,  $\mu_m = \mu_0(1 + \chi_d)$ . Como ocurre que el periodo del CMA, T (del orden del seg.)  $\gg \tau$  (anchura del potencial, del orden de los ms.), la energía media temporal almacenada será,

$$\langle e_M \rangle = (1/T) \int_0^T (B_0^2/2\mu_m) \text{sen}^2 \omega_M t \, dt = B_0^2/4\mu_m = \frac{B_{ef}^2}{2\mu_m}, \quad (5.18)$$

donde  $B_{ef} = B_0/\sqrt{2}$  es el campo magnético eficaz.

Pero una energía media significa que la energía “entregada” por el CMA a la membrana al cabo de un tiempo t de aplicación del campo magnético (energía almacenada en el medio diamagnético) es (ver Fig. 5.11),

$$\langle e_M \rangle t = (B_0^2/4\mu_m) t \quad (5.19)$$



**Figura 5.11.-** Energía media entregada en el tiempo por el campo magnético al medio diamagnético de la membrana. La línea es la energía media almacenada. Asimismo se representa un tren de impulsos de la neurona, con frecuencia  $\omega_0 \ll \omega_M$ .

De este modo la frecuencia media de disparo, que es la que experimentalmente se debe medir, deberá ser de la forma,

$$\omega(t) = \omega(0) \exp\left(-\alpha \left(\frac{B_0^2}{4\mu_m}\right) t\right), \quad (5.20)$$

es decir variable con el tiempo exponencialmente. Esto significa que no hay una disminución estocástica en el tiempo de canales abiertos, sino una exponencial debida a la energía magnética que se va acumulando en la membrana.

Ahora bien, la tasa de apertura de canales de  $K^+$ , debe ser  $p(t) = \omega(t)$ . Lo que experimentalmente medimos es el espectro de potencia en  $\omega_M$  (es decir la energía entregada por ciclo del CMA) o bien

$$P(t) = P(0) \exp(-\beta t), \quad (5.21a)$$

donde de ec. (5.20),

$$\beta \equiv \alpha \left(\frac{B_0^2}{4\mu_m}\right). \quad (5.21b)$$

Por tanto, si hacemos la transformada de Fourier en  $\omega_M$  (frecuencia del campo magnético aplicado) de  $P(t)$  obtendremos el espectro de frecuencias  $\omega_M$  de la frecuencia de disparo de la neurona, que es lo que medimos experimentalmente. Para ello escribamos de forma conveniente (donde  $\omega_0$  es la frecuencia espontánea de disparo de la neurona),

$$P(\omega_M) = p(0) \int_0^{\infty} \exp(-\beta t) \exp(i(\omega_M - \omega_0)t) dt = P(0) \frac{1}{(\omega_M - \omega_0)^2 + \beta} \quad (5.22)$$

o bien

$$\omega(\omega_M) = \omega(0) \frac{1}{(\omega_M - \omega_0)^2 + \beta}, \quad (5.23)$$

que es precisamente la lorentziana observada experimentalmente para la frecuencia de disparo, donde de ec. (5.23),  $(\Delta\omega/2) = \sqrt{\beta}$ , semianchura que ha sido arriba calculada, ec.(5.21b). Notar que  $\omega_0$  no es la  $\omega_0^*$  central del espectro lorentziano de un impulso. Por tanto no es necesaria la existencia de los campos magnéticos aleatorios producidos por las corrientes de ruido a través de la membrana o en el citoplasma (modelo de resonancia estocástica, ver por ejemplo revisión de Wellens et al., 2004); además en este modelo no se especifica el origen físico del “ruido estocástico”. La denominada “teoría estocástica” nos parece por tanto bastante matemática, y además no se ha comparado con ningún experimento relevante en neurofisiología (que conozcamos), para explicar las distribuciones de frecuencias observadas.

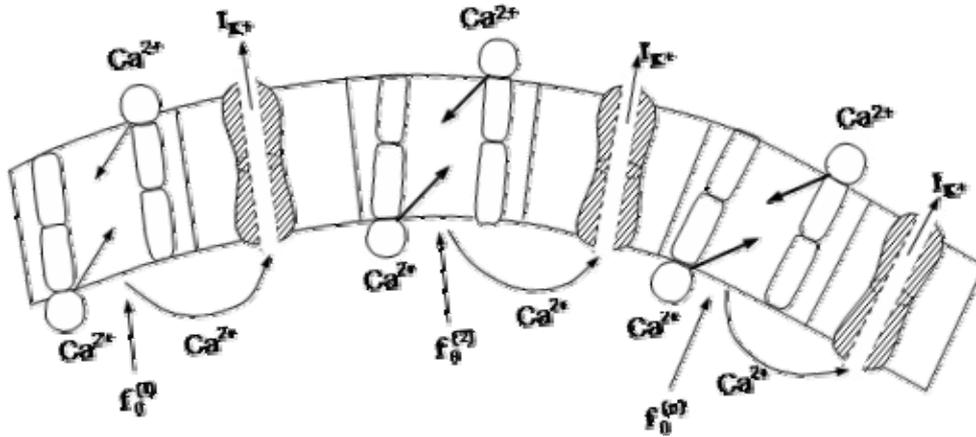
### 5.1.3.- EXTENSIÓN DEL MODELO HHM A DIVERSAS POBLACIONES DE CANALES DE $K^+$ E INTRODUCCIÓN EXPLÍCITA DEL CAMPO APLICADO B

Vamos a extender el modelo HHM (sección 5.5.1), introduciendo ahora dos consideraciones más realistas, y es considerar la existencia de diversas poblaciones diferentes de clústeres PP + proteína canal de  $K^+$  (PPs + PK) (ver esquema de Fig. 5.12). Llamaremos:

$\omega_0$  = frecuencia media espontánea de la neurona

$\omega_0^i$  = frecuencia espontánea del sistema i (clúster de PP + PK), donde por simplicidad sólo se ha insertado un par de PP-NN entre dos canales de proteínas sucesivas.

$\omega_M$  = frecuencia del campo magnético alterno aplicado a la membrana, B(t).



**Figura 5.12.-** Esquema de membrana con diversas poblaciones de clústeres PP + proteína canal de  $K^+$ , con los PP cargados dispuestos como vecinos más próximos (NN). Por repulsión coulombiana se suelta el  $Ca^{2+}$  que interacciona con el canal de  $K^+$  promoviendo la salida de este ión al medio extracelular ( $I_{K^+}$ ).

La frecuencia *media* de disparo del sistema cluster de PPs + PK bajo campo magnético aplicado,  $B = B_0 \text{sen } \omega_m t$  de período  $T \gg$  anchura del impulso,  $\tau$  es de acuerdo con la ec. 5.23,

$$\omega^i(B) = \omega_0^i \exp\left(-\frac{\alpha B_0^2}{2\mu_m}\right) \quad (5.24)$$

donde  $\alpha$  es el parámetro dependiente de las propiedades físico - químicas de la membrana, y que supondremos el mismo para todos los clústeres PP. En la ec. (5.24) se ha hecho la aproximación razonable (ver Fig. 5.11) de sustituir  $B(t)$  por su valor eficaz  $(B_0/\sqrt{2})$ , tal como obtuvimos en la ec. (5.18) La intensidad efectiva de corriente de  $Ca^{2+}$  por clúster de PP es  $I_i = \varepsilon_i f^i q$  ( $q = 2|e|$  carga del  $Ca^{2+}$ ), donde  $\varepsilon_i$  es una fracción de la corriente total producida por el canal  $i$ , es decir aquella que llega al canal (ver Fig. 5.7). Por tanto, la de todos los clústeres de fosfolípidos (PP) es la de toda la membrana, que será,

$$I_{Ca}(B) = \sum_{i=1}^N I_i(\omega^i, B) = \sum_i q \frac{\omega^i(B) A_i}{(\omega_m - \omega_0^i)^2 + (\Delta\omega_i/2)^2} \cong q \int \frac{\omega^i(B) A}{(\omega_m - \omega_0^i)^2 + (\Delta\omega_i/2)^2} d\omega_0^i \quad (5.25)$$

donde hemos asumido que las frecuencias  $\omega_0^i$  (la  $\omega_0^*$  característica de cada sistema PPs + PK) se distribuyen de forma continua al pasar a integral y supondremos una misma anchura de lorentziana,  $\Delta\omega$  y de amplitud,  $A$  la misma para todos los  $N$  sistemas PP + PK. Además  $A = A^*/g_k$ . Por tanto de acuerdo con ec. (5.9), la ecuación diferencial (de repolarización-hiperpolarización) de toda la membrana se obtiene sumando la ec. (5.9) a todas las estructuras PPs + PK de la misma, es decir

$$C_m \sum_i (dV_i / dt) = -g_k \sum_i (n_i)^4 (V_i - V_K) + q \int \frac{A_i \omega_0^i \exp(-\alpha B_0^2 / 2)}{(\omega_m - \omega_0^i)^2 + (\Delta\omega_i / 2)^2} d\omega_0^i, \quad (5.26)$$

donde  $q$  es la carga del  $Ca^{2+}$  ( $2|e|$ ). La solución de la ecuación homogénea (es decir de la repolarización-hiperpolarización), puede también escribirse de forma más simple como,

$$V_i = V_K + (V_i(0) - V_K) \exp(-t/\tau_i), \quad (5.27)$$

donde  $V_K$  es el potencial de equilibrio de Nernst para el  $K^+$ . Esto es así si en (5.13)

asumimos que  $\frac{g_K n_0^4 \tau}{4C_m} = 1$ , lo que nos proporciona que  $\tau_i = 4C_m / n_i^4 g_K$ , o valor del

tiempo de repolarización-hiperpolarización. Esta hipótesis simplifica notablemente la ec. (5.13), sin modificar la conclusión que extraeremos de este modelo. Por otro lado nos proporciona un valor plausible para el tiempo  $\tau_K$ . Este es el potencial espontáneo de repolarización-hiperpolarización de toda la membrana.

Calculemos ahora la corriente de repolarización-hiperpolarización ( $c_{rh}$ ) producida por el campo magnético alterno, que de acuerdo con ec. (5.26) es,

$$I_{Ca}(B_0, \omega_m) = q \exp(-\alpha B_0^2 / 2) \int_{\omega_1}^{\omega_2} \frac{A \omega_0^i}{(\omega_m - \omega_0^i)^2 + (\Delta\omega_i / 2)^2} d\omega_0^i = q \exp(-\alpha B_0^2 / 2) F(\omega_m), \quad (5.28)$$

donde la función  $F(\omega_m)$  nos proporciona la dependencia de la corriente de calcio con la frecuencia del campo magnético aplicado,  $\omega_m$ .  $\omega_1$  y  $\omega_2$  son respectivamente las frecuencias mínima y máxima de disparo de los clústeres PP + PK de la membrana. La integral anterior es inmediata y vale,

$$\int \frac{x \, dx}{(x - \omega_M)^2 + a^2} = (1/2) \ln \left[ (x - \omega_M)^2 + a^2 \right], \quad (5.29)$$

de donde, la corriente media eficaz y por tanto *continua* de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  debida al campo magnético alterno aplicado resulta finalmente,

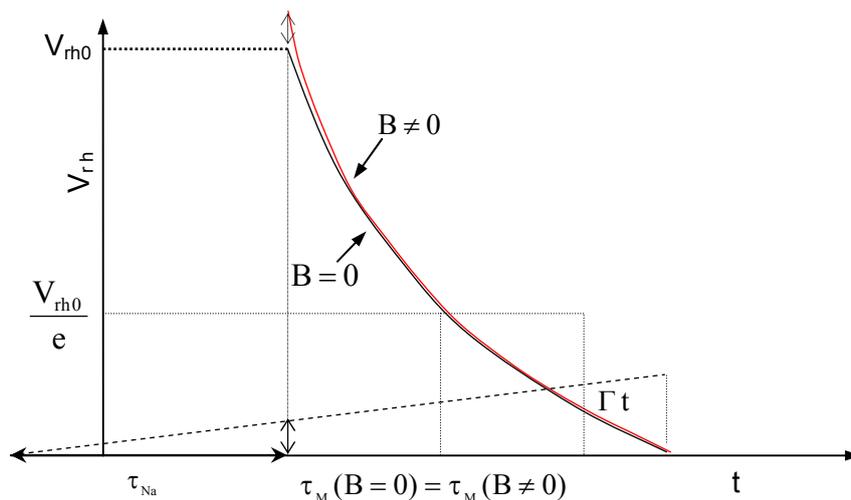
$$I_{\text{Ca}}(B_0, \omega_M) = (qA/2) \exp(-\alpha B_0^2/2) \ln \left( \left[ \frac{\omega_2 - \omega_M}{\omega_1 - \omega_M} \right]^2 + (\Delta\omega/2)^2 \right). \quad (5.30)$$

Esta expresión es un tanto compleja, y en ella aparecen las frecuencias extremas a altura mitad del espectro lorentziano, es decir  $\begin{pmatrix} \omega_2 \\ \omega_1 \end{pmatrix} = \omega_0^* \pm \Delta\omega/2$ . La anterior expresión (5.28) es la corriente total de los sistemas cluster PP + PK. Por tanto, el potencial de repolarización-hiperpolarización medible experimentalmente, bajo campo magnético, será, integrando ec. (5.6), de la forma,

$$V_{\text{rh}}(t) \cong V_i(0) - V_K(1 - \exp(-t/\tau_i)) + \frac{I_{\text{Ca}}(B_0, \omega_M)}{C_m}(t - \tau_{\text{Na}}), \quad (5.31)$$

cuya representación gráfica se muestra en Fig. 5.13, (y donde  $V_i(0)$  es el voltaje final de despolarización o  $V_{\text{Na}}$ ), y en la que el voltaje,  $V_i(t)$  evoluciona en el tiempo del  $V_{\text{Na}}$  al  $V_K$ . La corriente de calcio producida por campo magnético comienza ya durante la despolarización, aunque en esta fase no abre los canales de potasio, y es por ello que el origen de tiempo para  $I_{\text{Ca}}$  debemos retardarlo en  $\cong \tau_{\text{Na}}$ . Vemos por tanto, que el efecto del campo magnético es *aumentar* el tiempo efectivo de repolarización-hiperpolarización del potencial de acción,  $\tau_M$  conforme aumenta el tiempo,  $t$ , de exposición al campo magnético durante el desarrollo de cada impulso, creando así una anchura del potencial creciente con el tiempo, pero durante el tiempo que dura el impulso individual (del orden de ms). Este tiempo es muy pequeño y como vemos en la Fig. 5.13 el tiempo  $\tau_K$  varía despreciablemente al aplicar campo magnético. Esto es debido a que en cada potencial de acción las condiciones iniciales se restablecen y no hay efecto acumulativo de la corriente de calcio sobre  $V_{\text{rh}}$ , al secuestrarse iones de calcio liberados por el CM alterno entre disparos sucesivos, en la membrana y en los orgánulos celulares.

Por otro lado, y como se detallará en el sección 6.2, en la Fig. 6.7 mostramos la variación de la  $I_{Ca}(\omega_M)$ , dada por la ec. (5.30), la cual presenta un mínimo, en  $f_M = 10\text{ Hz}$  para la neurona F1.



**Figura 5.13.-** Experimentalmente no se observan cambios en el tiempo efectivo de repolarización-hiperpolarización del potencial de acción por efecto del campo magnético como predice en modelo. En su lugar los cambios han sido observados en la amplitud de los potenciales de algunas neuronas. De acuerdo con ec. (5.31), obtenemos que ( $\Gamma \equiv I_{Ca}/C_m = 10^{-25} \text{ mV}$ ).

Por tanto este modelo nos proporciona la variación del  $\tau_M$  (tiempo de relajación del canal PK) con la frecuencia del campo magnético,  $\omega_M$ , siendo esta variación dada implícitamente por ecs. (5.30) y (5.31). La observación experimental es que para ciertas neuronas  $\tau_M$  crece con  $\omega_M$  (a  $B_0$  fijo), de acuerdo con nuestro resultado teórico, pero la morfología del impulso bioeléctrico permanece inalterada. Aún cuando este es un resultado negativo del modelo, su importancia radica en precisamente explicar que lo que el campo magnético alterno aplicado produce es la variación de la frecuencia neuronal con la frecuencia del campo, pero sin modificar la morfología del impulso.

Finalmente tenemos que considerar que los canales de  $Ca^{2+}$ , abiertos por el  $Ca^{2+}$  liberado desde los clústeres de PP, pueden ser activados de la misma forma que los de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  intracelular. Este mecanismo es el que produce la estimulación del  $\approx 20\%$  de las neuronas bajo exposición a campo magnético. La

corriente exterior, transmembrana,  $I_{Ca}^{ext}(B)$  de  $Ca^{2+}$  tendría entonces la misma forma que la dada por la ec. (5.30) (aunque con algunos parámetros diferentes, propios del canal de  $Ca^{2+}$ ), y con un valor menor comparada con las corrientes de  $K^+$  y  $Na^+$  (alrededor de un 30%).

#### 5.1.4.- CÁLCULO DE LA EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL POTENCIAL DE DESPOLARIZACIÓN

Vamos finalmente a desarrollar un modelo sobre los efectos del CM de FEB sobre el proceso de despolarización (corriente de entrada de  $Na^+$  que se suma a la de calcio) operada por el voltaje transmembrana, partiendo del primer término de la ec. (5.5) para el proceso espontáneo y a partir de la variación con el campo magnético de este potencial mediante los canales de  $Ca^{2+}$  activados por el  $Ca^{2+}$  liberado desde los clústeres de fosfolípidos, nuevamente mediante el mecanismo propuesto en el modelo dMA. La ecuación diferencial para la despolarización es de la forma de la ec. de Hodgkin-Huxley,

$$C_m (dV_i^{Na} / dt) = -g_{Na} (m_i^3 h_i) (V_i - V_{Na}) - I_{Ca}(B), \quad (5.32)$$

donde  $m_i$  es proporcional al número de canales de sodio que permanecen cerrados hasta el tiempo  $t$ . En la situación espontánea (ausencia de CM,  $B = 0$ ) la resolución de esta ecuación es posible. El problema principal radica ahora en ver si el voltaje  $V_i^{Na}$ , que abre el canal de  $K^+$  puede ser modificado por el campo magnético aplicado, sin el concurso del  $Ca^{2+}$  liberado desde los clústeres de PP por el mecanismo de superdiamagnetismo y explosión coulombiana. Nótese que el potencial de membrana es  $V_m$  después de la actuación de la bomba de Na-K-ATPasa, que restablece el equilibrio iónico para el  $Na^+$  y el  $K^+$  de la neurona (tomaremos por sencillez  $V_m \equiv V_i(0) = 0$ ). El efecto del campo magnético estático sobre dicha proteína bomba se ha tratado en un trabajo previo, observándose que su efecto es disminuir dicho potencial en buen acuerdo con la teoría (Azanza y del Moral, 1996).

Para resolver la ec. diferencial (5.32) escribiremos a partir de ésta,

$$\int_0^t \frac{dV_i^{Na}}{(V_i^{Na} - V_{Na})} = -(g_{Na}/C_m) \int_0^t (m_i^3 h_i) dt \quad (5.33)$$

de donde como  $V_i^{Na}(0) = 0$  (comienzo del impulso, membrana en reposo) tendremos que

$$\ln \frac{V_i^{Na}(t) - V_{Na}}{-V_{Na}} = -(g_{Na}/C_m) \int_0^t (m_i^3 h_i) dt \quad (5.34)$$

Vamos ahora a suponer que la disminución de canales de  $Na^+$  activos a medida que progresa la despolarización sigue también la variación exponencial de ec. (5.7), con que tendremos que

$$m_i(t) = m_0 \exp(-t/\tau_{Na}) \quad (5.35)$$

con  $\tau_{Na}$ , el tiempo de relajación para la disminución de canales de  $Na^+$  que permanecen cerrados al cabo del tiempo  $t$ . Análogamente vamos a asumir que la inactivación del canal de sodio es de la forma

$$h_i(t) = h_0 \exp(+t/\tau_{in}) \quad (5.35')$$

donde  $\tau_{in}$  es el tiempo de inactivación en los canales de  $Na^+$  (obsérvese el signo positivo en la exponencial que crece con  $t$ , dado el efecto antagonista supuesto para  $h_i$  en la ec. HH).

Por tanto la ec. (5.34) adopta la forma

$$V_i^{Na}(t) = V_{Na} - V_{Na} \exp \left[ - (g_{Na}/C_m) \int_0^t (m_0^3 \exp(-3t/\tau_{Na}) h_0 \exp(t/\tau_{in})) dt \right] \quad (5.36)$$

La integral del segundo miembro es

$$\int_0^t \exp(-3t/\tau_{Na} + t/\tau_{in}) dt = (\tau_{ef}/3) \int_0^t \exp(-3t(\tau_{Na}^{-1} - (1/3)\tau_{in}^{-1})) d(3t/\tau_{ef}) = (\tau_{ef}/3) [\exp(-t/\tau_{ef}) - 1] \quad (5.36')$$

donde  $\tau_{ef}^{-1} = (\tau_{Na}^{-1} - (1/3)\tau_{in}^{-1})$ , proporciona el tiempo efectivo de relajación para la despolarización. El aparecer la suma de los tiempos  $\tau_{Na}$  y  $\tau_{in}$  es debido a que se trata de procesos de relajación independientes. Desarrollando ahora en serie la primera exponencial de la ec. (5.36'), en la forma vista en el modelo de sección 5.1.1, resulta finalmente un voltaje de despolarización de la forma,

$$V_i^{\text{Na}}(t) = V_{\text{Na}} \left( 1 - \left( g_{\text{Na}} m_0^3 h_0 \tau_{\text{ef}} / 3C_m \right) \exp(-t/\tau_{\text{ef}}) \right) \quad (5.37)$$

que crece exponencialmente con el tiempo  $t$  hacia  $V_{\text{Na}}$  (tampoco ahora hemos obtenido

una dependencia sigmoideal con el tiempo). Nótese que  $\frac{1}{\tau_{\text{ef}}} = \frac{1}{\tau_{\text{Na}}} - \frac{1}{3\tau_{\text{in}}} = \frac{3\tau_{\text{in}} - \tau_{\text{Na}}}{3\tau_{\text{Na}}\tau_{\text{in}}}$ ,

luego  $\tau_{\text{ef}} = \frac{3\tau_{\text{Na}}\tau_{\text{in}}}{3\tau_{\text{in}} - \tau_{\text{Na}}}$ , y  $\tau_{\text{Na}} \approx \tau_{\text{in}} \approx \tau$ , luego  $\tau_{\text{ef}} \approx \frac{3\tau^2}{2\tau} = 1.5\tau$ , con lo que  $\tau_{\text{ef}}$  debería

ser mayor que  $\tau_K$ , tal como se observa experimentalmente.

En conclusión, se predice que el voltaje de despolarización espontánea crece exponencialmente con el tiempo, hasta  $V_{\text{Na}}$  de Nernst, y que, aparentemente no es afectado por el campo magnético,  $\mathbf{B}$  aplicado (sólo podría serlo si  $h_0$  estuviese afectado por el campo magnético de FEB, cosa que de momento desconocemos). El efecto de  $I_{\text{Ca}}$  en la ec. (5.32) podemos descartarlo, dado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es sabido que no opera sobre los canales de  $\text{Na}^+$ .

## 6.- DISCUSIÓN Y COMPARACIÓN CON LOS MODELOS TEÓRICOS

### 6.1.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los experimentos se han realizado en los ganglios cerebroideos completos de *Helix aspersa*, registrando la actividad bioeléctrica desde el soma de una neurona individual, integrada en su ubicación histológica natural. La neurona en estudio, recibe neurotransmisores en los contactos sinápticos procedentes de otras neuronas, que estimularán o inhibirán su actividad. El microelectrodo introducido en el soma neuronal registra una actividad bioeléctrica que es la suma de todas las aferencias que la neurona recibe. Como resultado de esta integración postsináptica, se registra la actividad bioeléctrica que hemos quedado en definir como “actividad espontánea” o “actividad natural”, altamente específica cuando se registra desde el mismo “tipo” de neurona, desde especímenes diferentes, en experimentos distintos. El término “tipo” de neurona se utiliza para referirnos a una neurona localizada en el mapa de los ganglios cerebroideos (Fig. 3.6). La dinámica de realización de los experimentos se mantiene durante todo el estudio: un ganglio - una neurona - un experimento. El tiempo de duración del experimento depende del tipo de neurona en estudio, y del objetivo del mismo, variando desde unos pocos minutos hasta aproximadamente 2 horas. Controles realizados con la neurona V20 nos han permitido poner de manifiesto que la actividad espontánea se mantiene sin variación hasta 6h, después de realizado un experimento de aplicación de campo magnético, sin renovar la solución Ringer.

Teniendo en cuenta que la manipulación de los ganglios durante la disección, introducción en la solución Ringer e inserción del microelectrodo en la membrana (estímulo mecánico), alteran los equilibrios iónicos naturales, se espera el tiempo necesario para que se restablezcan las condiciones normales. Una vez conseguida la estabilidad en los patrones de frecuencia y amplitud de la actividad neuronal, se define, promediando en un intervalo de tiempo suficientemente largo, la *frecuencia de la actividad espontánea* de cada neurona. A esto se suma el registro histórico con el que contamos, constituido por el estudio de la actividad neuronal de aproximadamente 120 neuronas de las situadas en la superficie de los ganglios. Los experimentos se realizan en neuronas con diferentes patrones de actividad espontánea considerando el siguiente orden de prioridad: actividad natural constante en el tiempo (Figs. 4.33, 4.34

y 4.38), variable en el tiempo (Figs. 4.24, 4.29 y 4.43), y neuronas silenciosas (Figs. 4.41 y 4.42). En aquellas neuronas donde existe una tendencia natural a la disminución de la frecuencia y la presencia del campo magnético acentúa dicha respuesta, definimos las variaciones inducidas por la repetición de la correlación campo magnético aplicado/modificación de la actividad neuronal, en todos los experimentos realizados con el mismo tipo de neurona. En los casos en que el campo magnético induce aumento de la actividad bioeléctrica, la relación causa/efecto es evidente (Figs. 4.29, 4.30, 4.38, 4.41 y 4.42). La repetición de los resultados, bajo las mismas condiciones experimentales, en neuronas de muestras diferentes, es la confirmación que nos permite definir el efecto producido por el campo magnético aplicado.

El estudio morfológico y ultraestructural mediante técnicas de histología convencional, inmunocitoquímica y microscopía electrónica, nos ha permitido profundizar en la caracterización del sistema nervioso central de *Helix aspersa*. Todas las neuronas tienen morfología similar, esférica en solución Ringer (Fig. 3.2) y piriforme vistas en las secciones teñidas para microscopía óptica (Figs. 4.8 y 4.16a), por lo que la variable que se tiene en cuenta para distinguirlas es el tamaño relativo y su posición en los ganglios. Se han descrito una gran variedad de tamaños neuronales y de tipos de células de glía, además de los contactos que las células de glía establecen con las neuronas próximas, lo que ha permitido comprender su funcionalidad (Hernádi y Elekes, 1999). En nuestros estudios hemos encontrado dos tipos de células de glía asociadas con las neuronas (Figs. 4.3 y 4.6) y con las fibras nerviosas en el neuropilo (Fig. 4.4) respectivamente. Se localizan uniones tipo gap entre neuronas, entre células de glía (Figs. 4.3 y 4.6) y entre neuronas y células de glía (Figs. 4.6 y 4.7) y una alta densidad de membranas dispuestas entre las neuronas, y alrededor de los axones (Fig. 4.4). Los tipos de células de glía descritos (Joan, 1995) coinciden con la glía de insectos y crustáceos, y se han definido por su localización y morfología como glía plasmática o protoplásmica rodeando los somas neuronales en la periferia y glía fibrosa asociada con los axones (Radojic y Pentreath, 1979).

La glía asociada con neuronas grandes con cierta frecuencia penetra en las invaginaciones de la membrana plasmática neuronal formando la tropospongia (Fig.

4.7a). La estrecha relación entre neurona y glía en estas invaginaciones indica interacciones importantes entre ambos tipos de células. Es bien conocido que la glía es un soporte trófico para las neuronas, así como que la actividad de la glía es modulada por señales transmitidas desde las neuronas (Pentreath y Pennington, 1987).

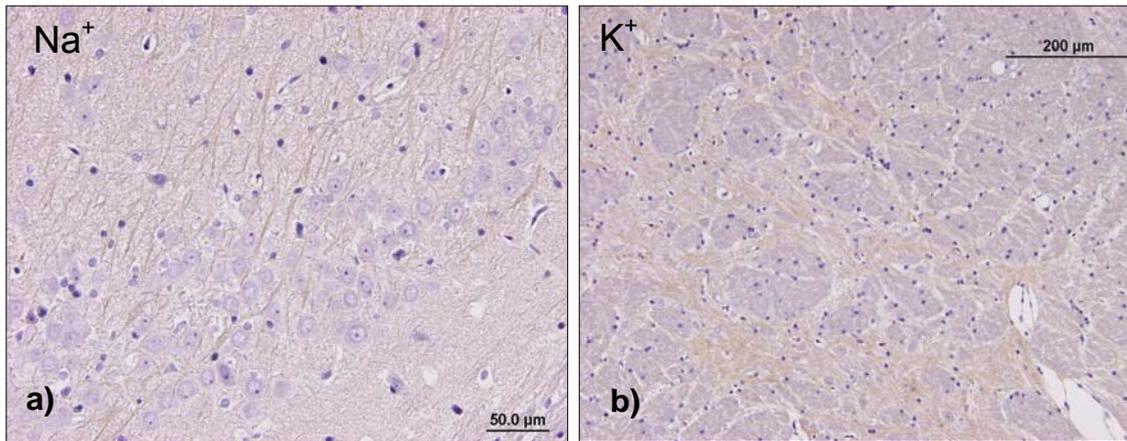
En un estudio comparado de los canales iónicos mayoritarios en los cordados y en un amplio grupo de invertebrados destacan los moluscos como la clase de invertebrados que expresa los mismos tipos de canales iónicos en relación con los cordados, referidos a canales de sodio, diversos tipos de canales de potasio, canales de calcio, receptores nicotínicos de la acetilcolina y canal de cloro activado por GABA (Tabla 6.1).

**Tabla 6.1.-** Evidencias de canales iónicos en eucariotas (Hille, 1992).

Phylum	Tipo de canal iónico							
	Canales de potasio					Ca	Nicot. AChR	GABA Cl
	Na	K	A	IR	K(Ca)			
<b>Chordata</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Vertebrata</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Cephalochordata</b>	++					++	+	
<b>Urochordata</b>		++		++	+	++	+	
<b>Echinodermata</b>		++		++		+	++	
<b>Chaetognatha</b>	++	+				+		
<b>Mollusca</b>	++	++	++	++	++	++	++	++
<b>Arthropoda</b>	++	++	++		++	++	++	++
<b>Annelida</b>	++	++		+		++	++	++
<b>Nematoda</b>						++	++	++
<b>Platyhelminthes</b>	+	+			+		+	+
<b>Ctenophora</b>		+	+		+	++		
<b>Cnidaria</b>		+	++	+	+	+		
<b>Porífera</b>								
<b>Protozoa</b>		++	+	+	+	++		
<b>Fungi</b>		++				+		
<b>Green algae</b>		++				+		
<b>Flowering plants</b>		++		++				

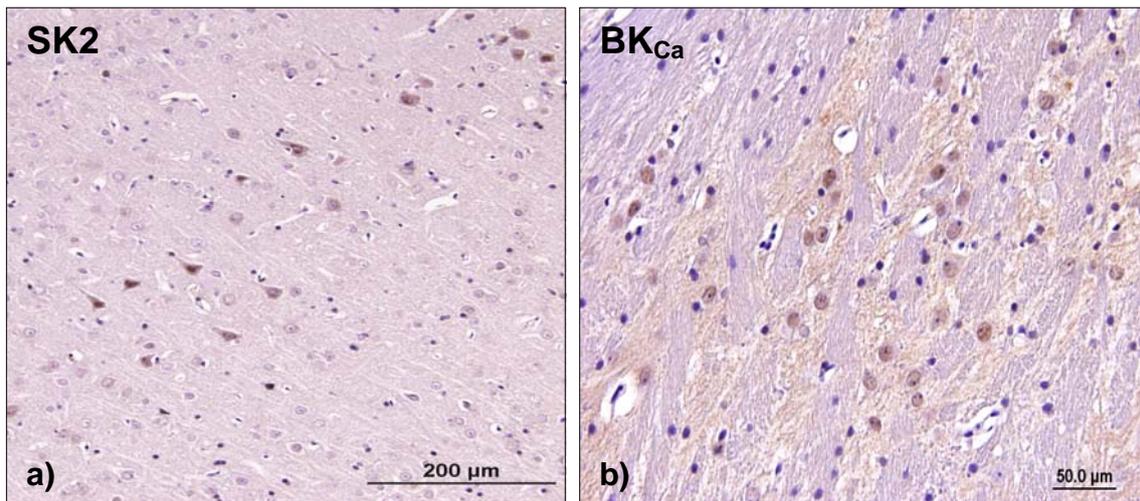
+ alguna evidencia  
++ convincente evidencia eléctrica y farmacológica

Las características de la actividad bioeléctrica de una neurona debe de estar correlacionada con la densidad, localización y distribución de sus canales iónicos. Para que una neurona desarrolle y mantenga un repertorio específico de características funcionales, los canales iónicos deben ser sintetizados y transportados continuamente a sitios específicos para ser insertados en la membrana celular en un proceso constante de renovación celular (Siegel et al., 1994). Los resultados que hemos obtenido de la caracterización de proteínas canales iónicos por inmunocitoquímica revelan que aproximadamente el 100% de las neuronas son positivas para los canales de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> de rectificación retardada. Se localizan tanto en el soma neuronal como en los axones. La reacción positiva para los canales de sodio se observa en el seno del citosol (Fig. 4.11), lo que quiere decir que se están revelando las proteínas que se están sintetizando. Sin embargo, se puede observar que los canales de potasio de rectificación retardada además de observarse en el seno del citosol, se han caracterizado en algunas neuronas en localizaciones más precisas próximos a las membranas (Fig. 4.14). Estos resultados son interesantes puesto que en neuronas de mamíferos estos dos tipos de canales se localizan fundamentalmente en los axones y, en las fibras con envoltura de mielina (células de Schwann), en los nodos de Ranvier en mayor proporción que en el soma neuronal o las dendritas. Estos resultados los hemos corroborado en los controles de la reacción de inmunocitoquímica realizados en encéfalo de rata, donde se ha puesto de manifiesto, como es característico, una mayor densidad de reacción en la zona de fibras (Figs. 6.1a y b). Las neuronas de *Helix aspersa* son monopolares, es decir, no tienen ramificaciones dendríticas y la localización de los canales de sodio y potasio de rectificación retardada en el soma neuronal explica los registros obtenidos de la actividad bioeléctrica neuronal.



**Figura 6.1.-** EnVisión®. a) 20X. Canales de sodio. b) 10X. Canales de potasio operados por voltaje de rectificación retardada. Se observa para ambos canales mayor densidad de reacción en la zona de fibras.

Los canales de potasio activados por el calcio intracelular se expresan en aproximadamente el 90% de las neuronas (Figs. 4.15 y 4.16). Los canales, SK2 y BK<sub>Ca</sub> tienen una localización precisa en zonas determinadas de la membrana (Fig. 4.15) y llama la atención la reacción positiva a nivel de los núcleos de las neuronas para los BK<sub>Ca</sub> (Fig. 4.16). Este aspecto se repite en el encéfalo de rata (Figs. 6.2a y b).



**Figura 6.2.-** EnVisión®. a) 10X. Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> intracelular de pequeña conductancia, SK2. b) 20X. Canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> intracelular de alta conductancia, BK<sub>Ca</sub>. Se observa reacción positiva en los núcleos para el BK<sub>Ca</sub>. Para ambos canales la reacción posee una localización precisa en determinadas zonas de la membrana.

En relación con los canales de calcio, los de tipo L se expresan en el  $\approx 56\%$  y los de tipo P/Q y N en el  $\approx 7\%$  de las neuronas. La localización de estos canales es precisa en zonas determinadas de las membranas del soma neuronal (Figs. 4.12 y 4.13). En neuronas pequeñas se observa una alta densidad en el seno del citosol, debido probablemente a la relación superficie/volumen en comparación con las neuronas grandes (Fig. 4.13b). En mamíferos los tres tipos de canales N, P y Q se localizan fundamentalmente en los terminales de los axones y se consideran ser los responsables de la liberación de los neurotransmisores (Tritsch et al., 1998). En el caso de neuronas de moluscos los encontramos indistintamente en la membrana del soma neuronal y en los axones. En relación con los canales de calcio tipo L (Fig. 4.17) se ha descrito que en mamíferos se encuentran en dendritas y membrana del soma, considerándose que el calcio que entra por esta vía tiene una gran importancia en la activación de la expresión génica de proteínas, acoplada a la actividad electrofisiológica de superficie. Su función en la liberación de neurotransmisores se considera nula. Es interesante que en neuronas de moluscos se haya observado, al igual que en mamíferos, reacción positiva a nivel del núcleo neuronal. La positividad observada en los núcleos de las neuronas de molusco para los canales  $BK_{Ca}$  y  $Ca^{2+}L$  indican la posibilidad de un acoplamiento entre la actividad bioeléctrica de la membrana plasmática y las actividades metabólicas del núcleo. Merece la pena destacar que estos dos tipos de canales son, entre el conjunto de los canales iónicos estudiados, los de mayor significación como mediadores de los efectos inducidos por la exposición a campo magnético. De aquí se induce la posibilidad de que el campo magnético pueda inducir efectos en la regulación de la expresión génica.

Nuestros datos de exposición a campos magnéticos muestran que el 82% de las neuronas son sensibles al CMA, en un 50% de las neuronas la frecuencia disminuye y eventualmente quedan inhibidas, en un 20% la frecuencia aumenta siendo estimuladas, y el 12% restante presenta respuestas bifásicas, de estimulación e inhibición. Se ha demostrado experimentalmente que como resultado de la interacción del campo magnético con la membrana plasmática se liberan iones de calcio en el citosol y que los efectos observados de inhibición y de estimulación de la actividad bioeléctrica son consecuencia de las acciones subsiguientes promovidas por el incremento del calcio libre en el citosol (Azanza, 1993; Azanza y del Moral, 1998;

Calvo y Azanza 1999a; del Moral et al., 2002). La disminución de la frecuencia de las neuronas se explica por la activación directa de los canales de potasio por el calcio intracelular, la salida de potasio al medio extracelular produce la hiperpolarización de la membrana y de ahí la disminución de la frecuencia y eventual inhibición de la actividad bioeléctrica (Azanza y del Moral, 1994). En la subpoblación de neuronas estimuladas por el campo magnético el calcio promueve directamente la despolarización de la membrana y de ahí la estimulación. Estos resultados se obtuvieron de experimentos realizados modificando las concentraciones iónicas en la solución Ringer (Azanza y del Moral, 1994) y comparando los efectos miméticos inducidos por el campo magnético aplicado con los inducidos por la cafeína (Calvo y Azanza, 1999b) y por el glutamato, sus agonistas y antagonistas (Azanza et al., 2005b). La falta de magnetosensibilidad en el 18% de las neuronas estudiadas consideramos que se debe a que en este grupo de neuronas la función del calcio como segundo mensajero no es tan importante como en la población neuronal mayoritaria.

En este trabajo, mediante el estudio de inmunocitoquímica, hemos tratado de relacionar las respuestas neuronales con los canales iónicos que las neuronas individualmente expresan. Si comparamos los datos obtenidos, bajo exposición a campo magnético, con los de inmunocitoquímica relativos a la expresión de canales iónicos por las neuronas se observa que los resultados son consistentes cualitativamente. A grandes rasgos los datos numéricos muestran una tendencia que pueden explicar nuestras observaciones. El 100% de las neuronas son capaces de producir potenciales bioeléctricos de gran amplitud por la presencia de canales de sodio y potasio de rectificación retardada que se expresan en el 100% de las neuronas. En el 50% de las neuronas la actividad disminuye por la hiperpolarización de la membrana, este aspecto lo relacionamos con la expresión de los canales de potasio activados por calcio intracelular que se expresan en el 90% de las neuronas. La estimulación inducida por el calcio se observa en el 20% de las neuronas estudiadas, esta actividad consideramos que se corresponde con los canales de calcio tipo L que se expresan en el 56% de las neuronas. Debemos de tener en cuenta que los resultados de inmunocitoquímica se han obtenido de estudios en los que se han hecho recuentos del 100% de las neuronas de los cortes seriados obtenidos de todo el

volumen de los ganglios en profundidad. Si tenemos en cuenta que los estudios de electrofisiología se hacen en una selección de neuronas de las localizadas en superficie, las de mayor tamaño y sobre un número de aproximadamente 120 neuronas los datos obtenidos son excelentes.

Por otra parte la técnica de Inmunocitoquímica nos ha permitido caracterizar los canales iónicos que expresa una neurona específica como es el caso de la F1 (Figs. 4.19 - 4.22). Los experimentos de electrofisiología realizados con esta neurona se muestran en la Figs (4.26 - 4.27). Por el patrón de actividad bioeléctrica se puede considerar que la neurona F1 es sensible al calcio. Se observa una disminución de la frecuencia de los potenciales y un cambio en la morfología a una típicamente dependiente de calcio caracterizada por actividad de reclutamiento con potenciales en ráfagas de amplitudes variables crecientes y decrecientes, que indica un potencial de equilibrio para el calcio por encima del potencial de equilibrio del sodio. Las ráfagas están separadas por inhibiciones de larga duración que se deben a la estimulación de los canales de potasio dependientes de calcio intracelular.

La correspondencia entre la actividad electrofisiológica de las neuronas bajo la acción de campo magnético y el tipo de proteínas canal que expresan pone de manifiesto el papel de los canales iónicos en las modificaciones de la actividad bioeléctrica neuronal bajo acción del campo magnético.

La mayoría de los datos experimentales obtenidos por la aplicación de campo magnético de FEB sobre neuronas de moluscos (Danilov et al., 1986), células musculares (Gundersen et al., 1986) y axones (Ueno et al., 1986) son contradictorios y en la mayoría de los casos, la explicación de los resultados observados a nivel celular o molecular se ha hecho de forma elusiva. Los datos más consistentes, a nivel molecular, son los relativos a la movilización de los iones  $Ca^{2+}$  en el citosol y la modificación de su cinética a través de la membrana plasmática (Kavaliers y Ossenkopp, 1986; Lindström et al., 1993; Liburdy et al., 1993). Diversos experimentos han confirmado que el calcio juega un papel fundamental en las respuestas inducidas en células bajo exposición a CEM. En el estudio de los efectos de los CEM en el sistema nervioso, se ha demostrado su influencia en las modificaciones de los flujos

transmembrana de  $\text{Ca}^{2+}$  en preparaciones de encéfalo de gato y pollo, *in vitro* (Bawin y Adey, 1976; Blackman et al., 1982), de sinaptosomas de rata (Lin-Liu y Adey, 1982) de células de neuroblastoma (Korzh-Sleptsova et al., 1995) y neuronas de *Helix aspersa* (Azanza y del Moral, 1994; Galvanovskis et al., 1994; Hemmersbach et al., 1997). El promedio de la concentración intracelular de calcio está altamente relacionada con la actividad eléctrica de la neurona y este ión desempeña un papel relevante en los procesos de regulación de los canales (Siegel et al., 1994). En condiciones normales, debido a la homeóstasis intracelular del calcio, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es muy baja ( $\approx 10^{-4}$  mM) en comparación con el medio extracelular ( $\approx 1$  mM) (Alberts et al., 2002). Los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ , como segundos mensajeros, participan en la transducción de señales desde la superficie celular hasta el medio intracelular. Es de destacar la reacción positiva por inmunocitoquímica de los canales de calcio tipo L que hemos encontrado en las membranas y en los núcleos de las neuronas, así como la reacción positiva en las mismas localizaciones para los canales de potasio dependientes del calcio intracelular tipo  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . Estos resultados sugieren una interacción entre la emisión de potenciales de acción, fenómeno de superficie, y los mecanismos de transducción de proteínas en el núcleo. Como se ha señalado anteriormente este proceso se ha considerado como eslabón indispensable del mecanismo de amplificación de la interacción del CMA con la membrana plasmática. Como muestran nuestros resultados estos dos tipos de canales iónicos son los de mayor significación en los efectos electrofisiológicos inducidos por la exposición a campo magnético. Algunos autores sugieren una interacción directa de los campos magnéticos sobre los canales iónicos de la membrana plasmática, y en particular, sobre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, no se han encontrado respuestas en experimentos realizados con patch-clamp (Obo et al., 2002).

Del rango escogido de frecuencias que comprende las típicas de la actividad electroencefalográfica en humanos, se han aplicado los valores de frecuencia coincidentes con los ritmos específicos bien definidos: Delta (1 - 4 Hz), Theta (5 - 7 Hz), Fusiformes (7 - 14 Hz), Alfa (8 - 12 Hz), Mu (12 - 18), Beta (15 - 30) y Gamma (30 - 80 Hz). La sensibilidad de las neuronas al campo magnético aplicado se pone de manifiesto por la rápida modificación en el patrón de actividad espontánea (4.23 - 4.29). La realización de estos experimentos fue fundamental para definir la sensibilidad de

las neuronas al cambio de frecuencia del campo magnético, la existencia de bajas frecuencias para las cuales la respuesta neuronal es máxima y para poner de manifiesto que estas frecuencias son las próximas a la frecuencia de disparo natural de la neurona en estudio (Fig. 4.29).

Para condiciones experimentales de intensidad variable y frecuencia del campo magnético constante y próxima a la natural de la neurona, se repiten los cambios bruscos en la actividad neuronal una vez iniciada la aplicación del campo magnético (Figs. 4.30 y 4.31). En las Figs. 4.32, 4.33 se observa que la respuesta se produce para el valor más bajo de intensidad del campo magnético aplicado (0.2 y 0.88 mT). Se pone de manifiesto la magnetosensibilidad y se observa una coincidencia con el tipo de respuesta típicamente dependiente de calcio. El aumento de amplitud característico observado en la Fig. 4.34 se puede explicar debido a la siguiente secuencia de procesos: el campo magnético aumenta la concentración de calcio libre citosólico, que activa la corriente de calcio intracelular, por lo que el potencial de despolarización se desplaza hasta alcanzar el valor  $V_{Ca}$ , que en esta neurona está por encima del valor del  $V_{Na}$ . La corta duración de los potenciales de gran amplitud dependientes del calcio intracelular, se debe a la puesta en marcha de los mecanismos de regulación de la concentración de calcio en el citosol: ATP-*asas* de  $Ca^{2+}$ , orgánulos de secuestro como son el retículo endoplasmático liso, las mitocondrias, los calciosomas y las proteínas fijadoras de  $Ca^{2+}$  libre en el citosol tipo calmodulina.

Hemos demostrado que las neuronas responden de forma inmediata una vez iniciada la aplicación del campo magnético (Figs. 4.35, 4.36 y 4.37). Se destaca el hecho de que las respuestas son máximas cuando la frecuencia del campo magnético es comparable a la frecuencia natural de la neurona (Figs. 4.38 y 4.39). Estos resultados nos conducen a la consideración de la existencia de *ventanas de frecuencias* para nuestras condiciones experimentales utilizando campos magnéticos de baja frecuencia e intensidad (Pérez Bruzón et al., 2004; Azanza et al., 2005c).

En nuestros experimentos queda patente que cuando la frecuencia del campo magnético aplicado es igual a la frecuencia natural o espontánea de la neurona los

resultados obtenidos son máximos, caracterizados por un aumento súbito de la frecuencia y amplitud de los potenciales (Figs. 4.40 y 4.41). Estos resultados prueban, además, la existencia de un fenómeno de *resonancia en frecuencia*. En nuestros experimentos lo que hacemos coincidir es la frecuencia del campo magnético expresada en Hz con el número de potenciales bioeléctricos por segundo.

Hemos puesto de manifiesto la reversibilidad del efecto inducido, bajo aplicación de campo magnético tanto estático (Azanza, 1993) como sinusoidal de FEB (Azanza, 1993; Azanza et al., 2002a, Pérez Bruzón et al. 2005), comprobando que en algunos experimentos la frecuencia de los potenciales bioeléctricos, tras la exposición a campo magnético, alcanza valores próximos a los obtenidos en la actividad espontánea registrada en el experimento control, antes de la exposición al campo (Figs. 4.43 y 4.44). Ese aspecto es de especial interés y, de acuerdo con recientes descripciones de otros autores, coincidimos en que puede representar el indicio de un proceso de adaptación al campo magnético aplicado (de Pomerai, 2000; Azanza et al., 2002a). En nuestras condiciones experimentales podemos decir que las modificaciones no son estructurales sino funcionales, mediadas por calcio, y la maquinaria metabólica está preparada para corregir dentro de unos ciertos límites las alteraciones inducidas.

¿Qué significa que las neuronas pueden *adaptarse* a un campo magnético externo que está incidiendo continuamente?. Bajo exposición a campo magnético aumenta la concentración de calcio intracelular y para mantenerla en los límites normales, con el fin de controlar las funciones del calcio como segundo mensajero, las células requieren un consumo energético adicional para la síntesis de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , en la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático liso; síntesis de proteínas citosólicas fijadoras de calcio; mantenimiento de los calciosomas, etc. Simultáneamente la respiración oxidativa en las mitocondrias, que conduce a la síntesis de ATP, es activada por el calcio entrante. La medida en que el metabolismo mitocondrial se ve incrementado, por la demanda de los procesos arriba indicados, podría considerarse un indicador del *desgaste energético* que supone lo que podemos denominar como proceso de *adaptación al campo magnético externo*. El proceso de adaptación neuronal al campo magnético está asimismo reflejado en las respuestas de inhibición de la actividad electrofisiológica de las neuronas (observada en nuestros

experimentos en el 50% de las neuronas estudiadas). Gola y Crest (1993) demostraron en el soma neuronal de *Helix* que canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje y canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  de gran conductancia se disponen próximos, en zonas de membrana formando dominios bien definidos. De esta forma, la posible hiperexcitación inducida por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es contrarrestada rápidamente por la hiperpolarización de la membrana debido a la salida de iones de potasio. Es bien conocido el peligro que supone para las células el proceso de *citotoxicidad por calcio* (Mayer y Westbrook, 1987; Rothman y Olney, 1987, Choi, 1992), la disposición descrita de dominios de canales de potasio activados por calcio permite evitar, en condiciones metabólicas normales, que la activación por calcio se mantenga en las neuronas fuera de los límites fisiológicos adecuados. Gola y Crest (1993) describieron, además, la existencia de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  alejados de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje, los denominados *crypto-channels*. Estos canales de  $\text{K}^+$  son activados "tardíamente", con respecto al inicio del brote de excitabilidad, su función es el control de la posible hiperexcitabilidad. La difusión de los iones de calcio dentro del citoplasma está severamente limitada. La entrada del calcio ocurre en sitios muy determinados de la membrana y el incremento de la concentración de calcio debe ocurrir en el citoplasma próximo a la membrana. La localización descrita de los canales de potasio activados por calcio es coherente con nuestro concepto de los clústeres de membrana que actúa cooperativamente como resultado del superdiamagnetismo anisotrópico exhibido por las membranas de fosfolípidos (Azanza, 1993). En relación con nuestros experimentos hemos descrito que en el 12% de las neuronas estudiadas se observan respuestas bifásicas de estimulación - inhibición. De acuerdo con los datos de Gola y Crest (1993) nuestros experimentos podrían estar reflejando la ultraestructura de la membrana relativa a la disposición de los canales iónicos: en el 50% de las neuronas predominarían los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  por lo que la disminución de la frecuencia es inmediata a la aplicación del CM; en el 20% predominarían los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, incrementándose la frecuencia como respuesta a la aplicación del campo magnético; en el 12% la disposición relativa de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  explicarían las respuestas bifásicas, la estimulación inicial es seguida, con cierto retardo por la disminución de la frecuencia.

En experimentos en los que se han utilizado intensidades de campo magnético tres órdenes de magnitud inferior ( $\mu\text{T}$ ) se han modificado las condiciones de apantallamiento del ruido electromagnético ambiental adaptándolas a las bajas intensidades de campo magnético aplicadas (Fig. 3.12). En la Fig. 4.45 se observan los efectos inducidos en la actividad neuronal para los tres valores de frecuencia (50, 8.3 y 4 Hz) e intensidad (0.2, 2 y 12  $\mu\text{T}$ ) de campo magnético utilizado. Partiendo de estos resultados cabe preguntarse cuales son los umbrales de frecuencia y amplitud para los cuales dejan de observarse efectos. Si tomamos en consideración que los campos magnéticos asociados con la actividad neuronal natural son del orden de fT (9 órdenes de magnitud por debajo de los valores de intensidad de campo magnético utilizado en nuestros experimentos), es de esperar que incluso campos más bajos puedan tener algún efecto, como sucede en experimentos desarrollados en nuestro Laboratorio usando nanoT, con variaciones de frecuencia de décimas de Hz, resultados que no se presentan por no ser objetivo de este estudio (Maestú et al, 2006).

Las membranas neuronales son sistemas no lineales y excitables (brindan respuestas desproporcionadas en relación al estímulo que reciben) lo que les da la capacidad de responder a intensidades muy bajas de estimulación. Las intensidades de campo magnético utilizados pueden generar cambios en el potencial de membrana en el orden de los  $\mu\text{V}$ . Tales cambios son tres ordenes de magnitud inferior a los mV de despolarización que se requieren para activar los canales iónicos operados por voltaje. La respuesta conduce a un fenómeno de amplificación de la señal por un mecanismo de tipo resonante. Llama la atención la organización del sistema nervioso en el que existen un conjunto de mecanismos que favorecen dicho fenómeno. Entre ellos de destacan la formación de clústeres de canales y la amplificación por el aporte de redes neuronales. Una célula de Purkinje puede recibir información de 80000 neuronas con más de 200000 contactos sinápticos diferentes (Voogd y Glickstein, 1998). Pequeños cambios en las propiedades eléctricas de una célula individual pueden ser amplificadas miles de veces a través de las interacciones simultáneas de muchas otras células (Mathie et al., 2003).

Parece ser que cuando a las neuronas se les somete a una situación extrema responden con un patrón común, en el que se observa un proceso calcio dependiente que recuerda la posible reacción de *citotoxicidad por calcio*. Una situación de estas características la hemos producido aumentando la temperatura de la solución Ringer que baña las neuronas, y se puede observar en las Figs. 4.46 y 4.47 que con el incremento de la temperatura, la frecuencia de los potenciales bioeléctricos aumenta, y se observan valores para los cuales la actividad neuronal se desorganiza de forma muy definida. En la Fig. 4.46 se observa un cambio importante en el patrón de respuesta a los 37.1 °C, este mismo efecto es observado nuevamente en la Fig. 4.47 para las temperaturas de 31 y 38.5 °C. Estas modificaciones bruscas en la actividad neuronal se deben a que para estas temperaturas se producen transiciones de fase (de gel a cristal líquido) en los lípidos de membrana. Se ha descrito que para temperaturas cercanas a 33 °C pueden coexistir ambas fases y un incremento en la temperatura no conduce a la desaparición directa de la actividad celular (McElhaney, 1994), (ver Fig. 4.46). Para algunas membranas a temperaturas próximas a 40 °C la transición de fase puede tener consecuencias irreversibles en el funcionamiento de la maquinaria celular (Macdonald, 1994). Este proceso pudiera ser el reflejado en la Fig. 4.46 registros g y h y Fig. 4.47 registros 26 y 27.

Sobre la base del modelo de liberación de calcio por la reorientación de los fosfolípidos y la explosión coulombiana subsiguiente (del Moral y Azanza, 1992), el efecto del campo magnético debe ser dependiente de la temperatura. Para bajas temperaturas la viscosidad de la membrana aumenta y la reorientación de los fosfolípidos por la acción del campo magnético debe ser más lenta, e incluso puede llegar a no producirse, trayendo consigo una disminución del efecto inducido por el campo magnético (Fig. 4.47). Por otra parte, un incremento de la temperatura aumenta la fluidez de la membrana (Figs. 4.46 y 4.47) y el efecto del campo magnético de reorientación de los fosfolípidos debe ser facilitado, (Fig. 4.47). Estudios realizados en cerebro de pollo muestran que existe un rango de temperatura, alrededor de los 37 °C, para el cual aumentan los niveles iónicos y el efecto del campo magnético observado es máximo. Estos efectos no fueron observados para 36 y 38°C (Blackman et al., 1991).

Hemos visto que bajo la acción de un agente externo, ya sea un CEM o la temperatura, la neurona modifica su actividad natural. La respuesta suele ser inmediata, caracterizada en principio, por modificaciones en la frecuencia de los potenciales. Si los experimentos se realizan en condiciones para las cuales las neuronas muestran una marcada sensibilidad, dependiendo de las características intrínsecas de las neuronas, las modificaciones en frecuencia aparecen unidas a cambios en la amplitud (Figs. 4.49 - 4.51), lo que revela la puesta en marcha de funciones en las que la neurona pudiera estar especializada como puede ser la actividad neurosecretora (Fig. 4.51). La *actividad oscilatoria* define un comportamiento biológico rítmico, de importancia crucial en la transmisión de las señales intercelulares. En particular, son las neuronas marcapasos las que, con más frecuencia, muestran oscilaciones rítmicas y actividad de reclutamiento en forma de ráfagas de potenciales, que se repiten periódicamente (Figs. 4.25, 4.26 y 4.32). Este patrón de disparo es también característico de neuronas *marcapasos* de vertebrados (Lisman, 1997) y de neuronas con otro tipo de actividad, que pueden pasar a dicho patrón de respuesta bajo determinadas condiciones experimentales, como se ha demostrado en neuronas de molusco, bajo exposición a CEM de FEB (Hirsch, 1965; Bernardi et al., 1985; Azanza y del Moral, 1998). Estas oscilaciones rítmicas parecen ser necesarias para establecer interrelaciones entre grupos de neuronas altamente selectivas, incluso cuando la actividad bioeléctrica de alguna de ellas no sea rítmica (Steriade et al., 1994). Este proceso pudiera reflejar una actividad intrínseca de tales neuronas que es activada por la exposición a campo magnético alterno. Hemos demostrado experimentalmente con registros simultáneos desde pares de neuronas (Azanza et al., 2002; Azanza et al., 2005b) que la actividad de reclutamiento termina en la sincronización de la actividad bioeléctrica para el par de neuronas. El proceso de sincronización en una población de neuronas se considera un *código temporal* que incrementa la capacidad de transferencia de información. La coincidencia en el tiempo, de la actividad bioeléctrica de grupos de neuronas, proporciona una *estabilidad para* la propagación de la información. Por el contrario, la actividad bioeléctrica asincrónica, que se amortiguaría más fácilmente, presentaría una capacidad de transmisión de información más limitada. Cuando se aplica un estímulo externo de naturaleza oscilatoria, la señal periódica representa un reloj temporal externo que ajusta la fase de disparo de cada neurona en el tiempo. Es

decir, incrementa la coherencia de las respuestas bioeléctricas neuronales y la capacidad de procesamiento de la información (Yu et al., 2001). La capacidad del campo magnético de inducir estas respuestas en redes neuronales tiene una proyección práctica considerable. Es el caso del reciente tratamiento de pacientes con fibromialgia usando estimulación magnética transcraneal de intensidades en el orden de los nT y frecuencias extremadamente bajas (Maestú, 2005).

## 6.2.- COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES CON LOS MODELOS TEÓRICOS

Pasemos ahora a comparar nuestros resultados experimentales con los modelos teóricos expuestos en sección 5.

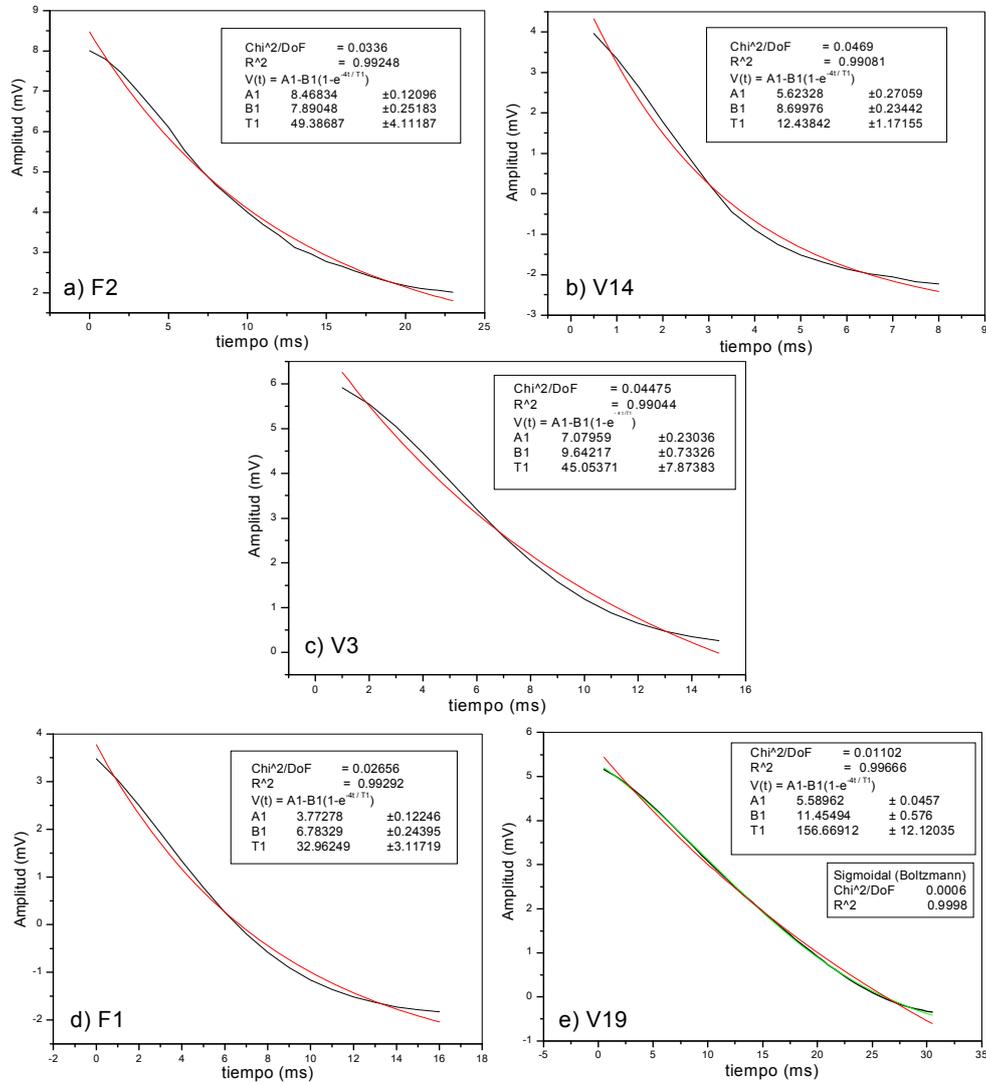
### *i) Potencial de repolarización-hiperpolarización, $V_{rh}(t)$*

En las Figs. 6.3 a-e se representan las curvas experimentales (líneas negras) con sus ajustes teóricos (líneas rojas) para la evolución del voltaje de repolarización-hiperpolarización ( $V_{rh}$ ) en el tiempo de cinco neuronas diferentes. En la Fig. 6.3e se muestra además el ajuste a una función sigmoideal (curva verde). Para las neuronas indicadas la evolución temporal de  $V_{rh}$  en el modelo teórico de la sección 5.5.1, ec. (5.13) ajusta adecuadamente los resultados experimentales obtenidos. La dependencia temporal de  $V_{rh}$  se ha ajustado por una función de la forma,  $V(t) = A_1 - B_1(1 - e^{-4t/\tau_k})$ . A partir de la

constante  $B_1 = (V_{Na} - V_K) \left( \frac{g_K n_0^4 \tau_k}{4C_m} \right)$  y tomando a partir del experimento los valores de  $B_1$

y los tiempos de relajación  $\tau_k = T_1$  indicados en la Tabla 6.2 y sustituyendo: el potencial de equilibrio para el sodio  $V_{Na} = 50 \times 10^{-3} \text{ V}$ ; el potencial de equilibrio para el potasio  $V_K = -75 \times 10^{-3} \text{ V}$ ; la conductancia de la membrana para el potasio  $g_K = 1.6 \times 10^{-7} \text{ m}^{-2} \Omega^{-2}$  y la capacidad de la bicapa de la membrana por unidad de área  $C_m = 4 \times 10^{-2} \text{ Fm}^{-2}$  obtenemos que el parámetro  $n_0$  toma los valores mostrados en la Tabla 6.2. El ajuste es francamente correcto, excepto en los límites extremos, lo que indica que no reproducimos la variación sigmoideal observada. La razón estriba en la aproximación del tiempo de relajación elegida para describir  $n(t)$ , es decir mediante la ec. (5.7). En el modelo HH tal variación se consigue suponiendo que  $n \propto V$ , y por tanto si ajustamos la curva

experimental mediante  $[V(t)]^4$  el ajuste es completamente correcto (variación sigmoideal, línea verde de Fig. 6.3e). No obstante no hay fundamento teórico conocido para suponer la anterior proporcionalidad, salvo que admitamos que el efecto que produce el potencial del ión  $\text{Ca}^{2+}$  unido a la molécula de calmodulina (Fig. 5.5) sea el de modificar su configuración, dando lugar a la apertura de la proteína canal de  $\text{K}^+$  (PK) y que además  $V(t) \propto V_{\text{Ca}}$ . Pero nótese que en tal caso lo que hacemos es ajustar  $V(t)$  por una función sigmoideal y esto es manifiestamente incorrecto, aunque sea el procedimiento fenomenológico que se viene usualmente utilizando hasta el presente (Tritsch et al., 1998).



**Figura 6.3.-** a) Neurona F2 de ganglio parietal derecho. b) Neurona V14 del ganglio visceral. c) Neurona V3 del ganglio visceral. d) Neurona F1 del ganglio parietal derecho. e) Neurona V19 del ganglio visceral. Se representa para cada neurona la evolución del potencial de repolarización-hiperpolarización con el tiempo. Las curvas de color negro se obtienen a partir de los datos experimentales y las rojas representan el ajuste a una función del tipo mostrado en el inserto. Las curvas teóricas no son del tipo sigmoideal observadas experimentalmente, debido a la aproximación del tiempo de relajación utilizada, para describir la función  $n(t)$ . La línea verde muestra el "ajuste" sigmoideal del  $V_{rh}(t)$  de la neurona V19.

**Tabla 6.2.-** Valores de  $n_0$  y  $\tau_k$  para cada una de las neuronas estudiadas, obtenidas del ajuste del potencial de repolarización-hiperpolarización.

Neurona	$n_0^4$	$n_0$	$\tau_k$ (ms)
F2	$127 \times 10^7$	188	49.4
V14	$553 \times 10^7$	272	12.4
V3	$168 \times 10^7$	202	45.0
F1	$162 \times 10^7$	200	33.0
V19	$156 \times 10^7$	155	156.7

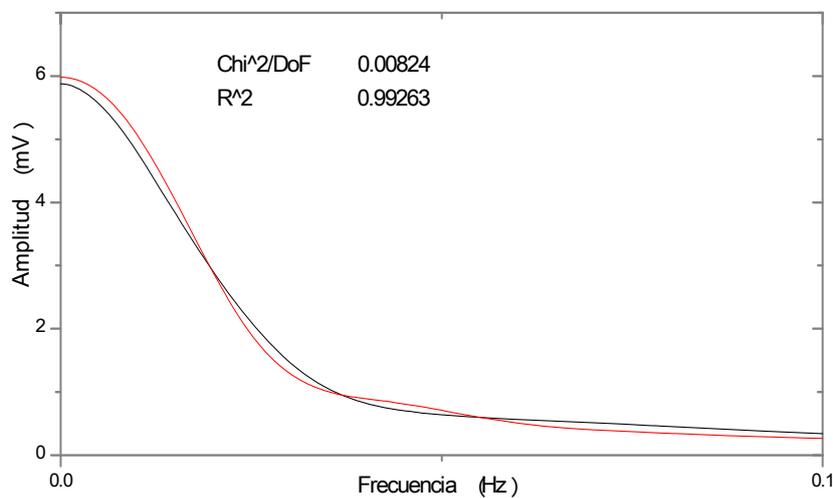
Por otro lado los valores de  $n_0$  para las neuronas consideradas en la Tabla 6.2, del orden de  $\approx 200$ , no pueden ser las concentraciones de canales PK en la membrana, del orden de  $7\text{PK}/\mu\text{m}^2$ , y por tanto  $n(t)$  no representa, como se supuso en el modelo, el número de canales PK cerrados hasta el tiempo  $t$ , con lo que  $n_0 \equiv n(0)$  debería de ser la densidad inicial de canales de  $K^+$ . Lo que sí es manifiestamente correcto es que la función  $[n(t)]^4$  elegida se corresponde con el proceso de captación en la calmodulina de 4 iones de  $\text{Ca}^{2+}$  con probabilidades independientes (Fig. 5.6). De todo lo anterior argumentaríamos que la naturaleza de la función  $n(t)$ , no explicada hasta ahora en la literatura (Lindsay et al., 2004; Clay, 2005), podría corresponder a la densidad real de canales PK,  $n_0^* \approx 7\text{canales}/\mu\text{m}^2$ , por un factor que tiene en cuenta el complicado mecanismo mediante el cual la calmodulina de despliega y abre el canal de  $K^+$ . De este modo  $n_0 = \gamma n_0^*$  podría tomar el valor obtenido, si  $\gamma \approx 155/7 \approx 22$  para V19. No obstante esta conjetura necesitaría una mayor cantidad de trabajo experimental y teórico para poder ser dada por válida.

Por otro lado los valores de  $n_0$  obtenidos para neuronas diferentes son manifiestamente del mismo orden de magnitud, lo que vendría a indicar que, cualesquiera que se la naturaleza fisicoquímica de este parámetro parece responder a un patrón único.

### ii) Espectro de frecuencia del impulso eléctrico

Pasemos ahora al cálculo del espectro de frecuencias del voltaje de repolarización-hiperpolarización. Para ello en la Fig. 6.4 se representa el espectro de frecuencia de dicho voltaje experimental (línea negra) y teórico (línea roja), calculado

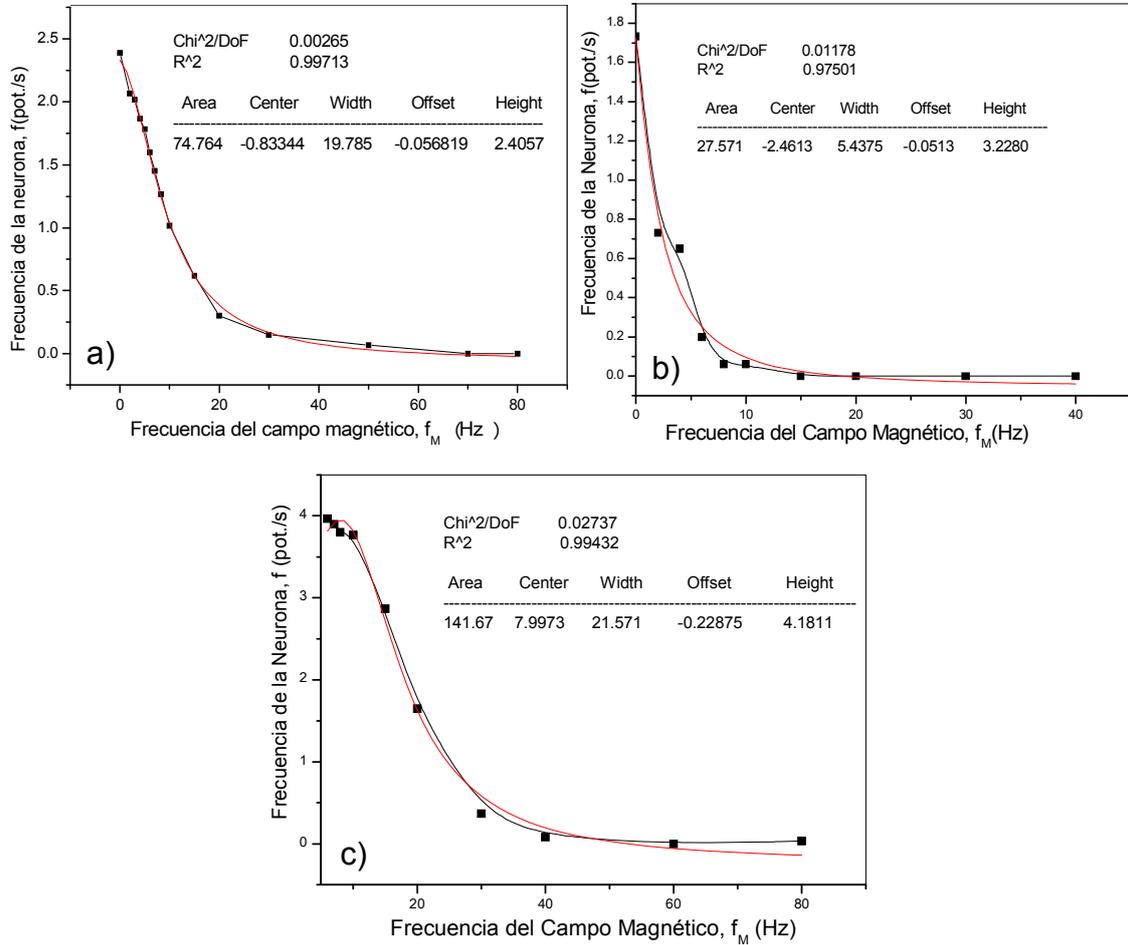
mediante la ec. (5.15). El espectro experimental se obtuvo mediante un análisis de Fourier del impulso de voltaje (Fig. 5.9). Haremos dos comentarios: la bondad del ajuste indica que, en efecto, la predicción teórica de un espectro lorentziano para un impulso único de voltaje es correcta. En segundo lugar, la anchura mitad  $\Delta f_{1/2} \approx 38$  mHz concuerda *marcadamente* con el ancho del impulso medido, por ejemplo entre 34 y 40 ms. para las neuronas F2 y V14, mostradas en las Figs. 4.49 y 4.50. En efecto  $\frac{1}{\Delta f_{1/2}} \approx 26$  ms .



**Figura 6.4.-** Neurona V19. Se representa el espectro de frecuencia de la amplitud de la repolarización-hiperpolarización. La amplitud se expresa en mV y la frecuencia en Hz. La curva de color negro se obtiene a partir de los datos experimentales y la roja representa el ajuste a una función lorentziana. Los valores correspondientes a la curva teórica muestran que los resultados experimentales pueden ser ajustados satisfactoriamente a una función lorentziana.

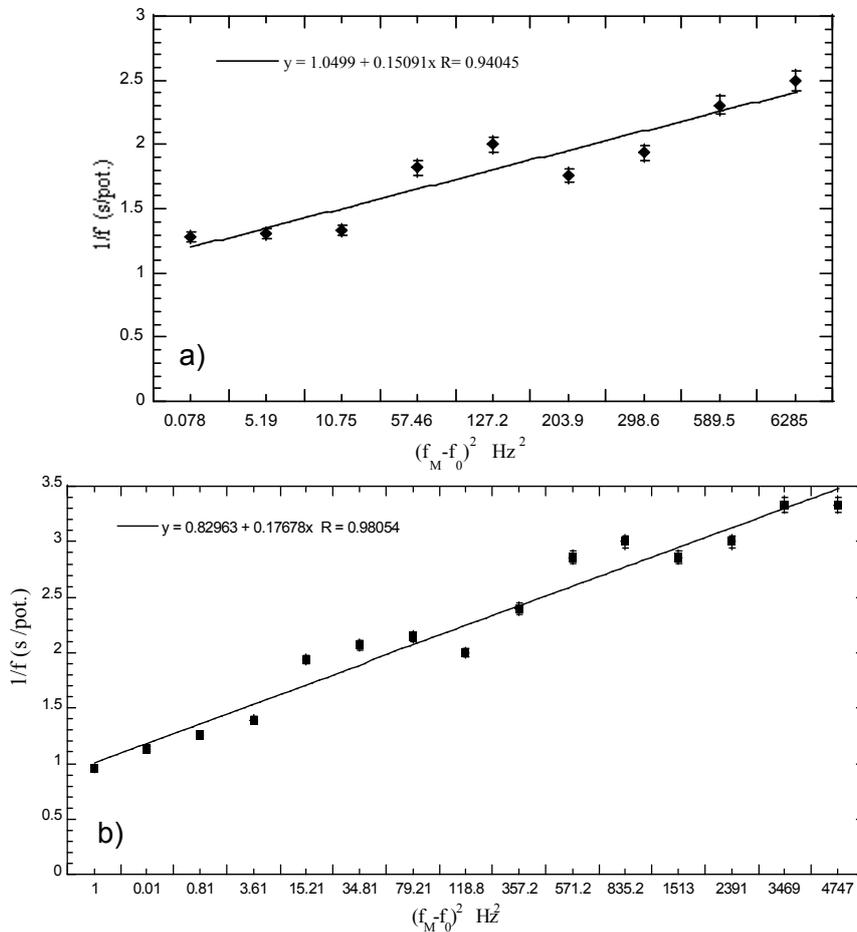
*iii) Variación de la frecuencia de disparo,  $f$  con la frecuencia del campo magnético alterno aplicado,  $f_M$ .*

Otra de las predicciones de nuestros modelos es la variación lorentziana de la frecuencia de la neurona con la frecuencia del campo magnético alterno aplicado. En las Figs. 6.5a, b y c se muestra la representación gráfica de la frecuencia de tres neuronas diferentes en función de la frecuencia del campo magnético aplicado. Las curvas negras se obtienen del experimento y las rojas son los ajustes teóricos. Se observa un comportamiento lorentziano y una elevada coincidencia entre las curvas experimentales (líneas negras) y las predichas por el modelo teórico (líneas rojas) de sección 5.5.2, ec. (5.23).



**Figura 6.5.-** a) Neurona F1 del ganglio parietal derecho, con HMHW  $\Delta f \approx 10$  Hz. b) Neurona V14 del ganglio visceral, con  $\Delta f \approx 2.7$  Hz. c) Neurona D1 del ganglio parietal izquierdo, con  $\Delta f \approx 10.8$  Hz. En a, b y c se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , expresada en (pot./s), en función de la frecuencia del campo magnético,  $f_M$ , expresada en Hz. Se aplica un campo magnético de 1mT de frecuencia variable en el rango de 2 a 80 Hz. Cada valor de  $f_M$  se aplicó durante 1min.

En las Figs. 6.6a y b se ha procedido a otro tipo de ajuste, representando  $1/f$  en función de  $(f_M - f_0)^2$ , siguiendo nuevamente la predicción de la ec. (5.23). Se ha calculado a partir de las pendientes de las rectas los valores de  $\Delta f$ . La linealidad observada indica que la dependencia  $f(f_M)$  es ciertamente de tipo lorentziano, es decir de la forma,  $\omega(\omega_M) = \omega(0) / \{(\omega_M - \omega_0)^2 + (\Delta\omega/2)^2\}$ , donde  $\Delta\omega = 2\pi\Delta f$  es la semianchura de la curva lorentziana, con máximo en  $\omega_M = \omega_0$  (es decir en la resonancia en frecuencia).



**Figura 6.6.-** a) Neurona V7 del ganglio visceral con HMHW,  $\Delta f \approx 2.6$  Hz. b) Neurona V19 del ganglio visceral, con  $\Delta f \approx 2.2$  Hz. Se representa el inverso de la frecuencia de disparo,  $1/f$  expresada en (s/pot.), en función de  $(f_M - f_0)^2$ , expresada en  $\text{Hz}^2$ . La frecuencia de la actividad espontánea es  $f_0$ . Se aplica un campo magnético de 1mT de frecuencia variable en el rango de 2 a 80 Hz. Para cada valor de  $f_M$  se aplicó el CM alterno durante 1min. La ventana de frecuencia HMHW es  $\Delta f$ . La línea recta es el ajuste teórico de ec. (5.23). Esto prueba claramente la respuesta lorentziana  $f(f_M)$ .

A partir de las relaciones  $\beta \equiv \alpha(B_0^2/4\mu_m)$ ;  $(\Delta\omega/2) = \sqrt{\beta}$  y  $\alpha = (N_p|\chi_\perp|V/2\mu_0 k_B T)$  deducimos que el número de fosfolípidos por clúster es  $N_p = \frac{2\mu_0^2 k_B T \Delta\omega}{|\chi_\perp| V B_0^2}$ . Tomando del experimento la anchura de la lorentziana,  $\Delta\omega = 2\pi\Delta f$  y sustituyendo la permeabilidad del vacío  $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ Hm}^{-1}$ , la constante de Boltzmann  $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$ , la temperatura  $T \approx 300\text{K}$ , la susceptibilidad perpendicular  $\chi_\perp = 0.38 \times 10^{-7}$ , el volumen de los PP considerados con forma de bastón  $V = 5 \times 10^{-28} \text{ m}^3$ , y la inducción magnética  $B_0 = 1 \times 10^{-3} \text{ T}$  obtenemos los valores de fosfolípidos por clúster,  $N_p$ , para las neuronas estudiadas (Tabla 6.3).

**Tabla 6.3.-** Valores del número de fosfolípidos por clúster,  $N_p$  para cada una de las neuronas estudiadas, obtenidos a partir de la medida de la semianchura (HMHW) de la lorentziana  $f(f_m)$ .

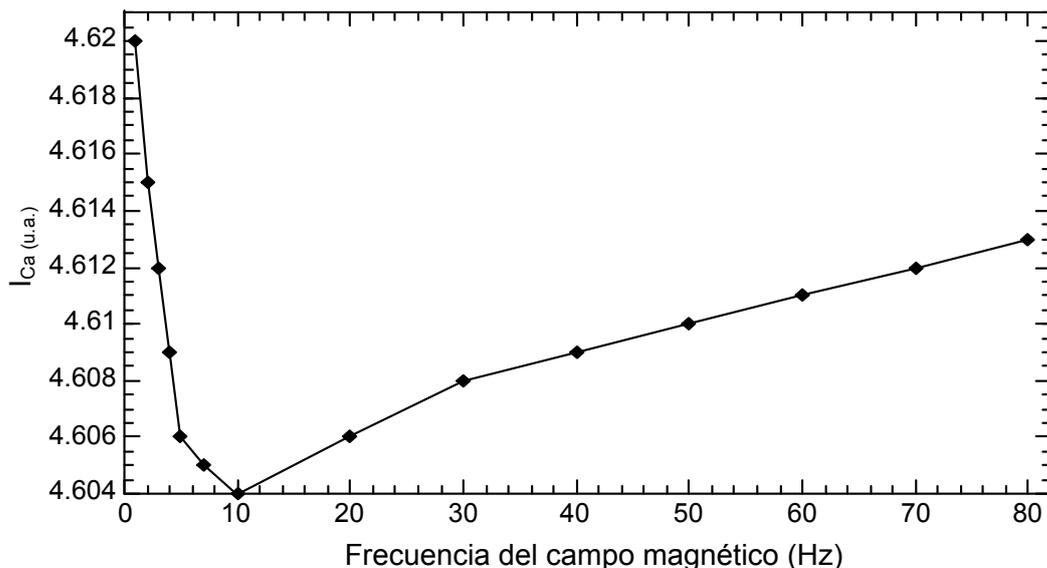
Neurona	$N_p$
F1	$27 \times 10^{11}$
V14	$19 \times 10^{10}$
D1	$32 \times 10^{11}$
V7	$18 \times 10^{10}$
V19	$13 \times 10^{10}$

El valor de  $N_p$  obtenido es consistente con resultados previos (del Moral y Azanza, 1992; Azanza y del Moral, 1994). Estos autores obtuvieron clústeres de lípidos con  $N_p = 3 \times 10^8$  moléculas a partir de medidas de imanación diamagnética en membranas bajo la acción de un campo magnético estático de 0.3T. Bajo la acción de un campo magnético alterno debe aumentar el número de lípidos por clúster que participa en la respuesta neuronal y esto explica en parte la mayor sensibilidad que muestran las neuronas a un campo magnético alterno respecto a uno estático (Azanza et al., 200b).

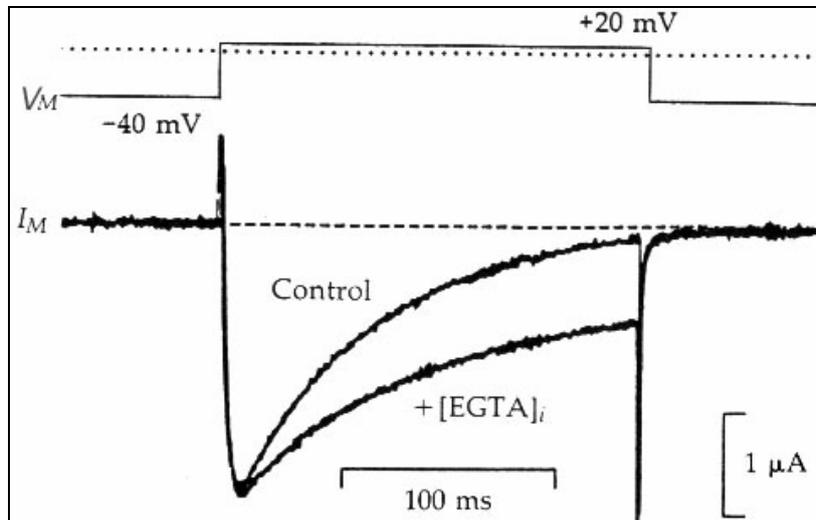
*iv) Dependencia de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  con la frecuencia del campo magnético alterno aplicado*

En la Fig. 6.7 se muestra gráficamente el comportamiento de la corriente de calcio ( $I_{\text{Ca}}$ ) con la frecuencia del campo magnético aplicado calculada mediante la ec. (5.30) del modelo teórico de la sección (5.5.3). Se observa que  $I_{\text{Ca}}$  posee un mínimo en  $f_m = 10 \text{ Hz}$  para la neurona F1. La evolución de la corriente de calcio con la frecuencia

del campo magnético aplicado es consistente con el mecanismo de acción propuesto por del Moral y Azanza en 1992 para campo magnético constante. Según este mecanismo un campo magnético de baja frecuencia e intensidad puede producir un incremento de calcio citosólico en un factor de 10. Tomando en consideración la naturaleza excitable de las neuronas dicho cambio en la concentración de calcio intracelular es suficiente para explicar las modificaciones observadas en la actividad electrofisiológica neuronal bajo campo magnético aplicado. El mínimo de la Fig. 6.7 puede ser interpretado como una medida de la oposición que ofrece la neurona al incremento del calcio intracelular inducida por la acción del campo magnético. A esta frecuencia es el propio calcio intracelular el que inhibe a los canales de calcio. Estos resultados son consistentes con estudios realizados en neuronas de *Aplysia*, donde se observa que la inyección de EGTA, molécula que actúa como fijadora de calcio y mantiene bajos niveles de concentración de calcio intracelular, produce un retardo en la inactivación de la  $I_{Ca}$  (Eckert y Tillotson, 1981) (ver Fig. 6.8). No obstante pensamos que no es esto lo que ocurre bajo la acción de un campo magnético alterno o continuo como quedó demostrado en la sección (5.1.3), y por tanto este mínimo no debe estar directamente relacionado con la inhibición de los canales de calcio por el propio calcio. Es de esperar que medidas de la  $I_{Ca}$  transmembrana muestren la dependencia de la Fig. 6.7, pero este es un tema abierto en esta memoria.



**Figura 6.7.-** Neurona F1. Se representa la evolución de la corriente de calcio en función de la frecuencia del campo magnético aplicado. Se observa un mínimo para la frecuencia del campo magnético de 10 Hz.

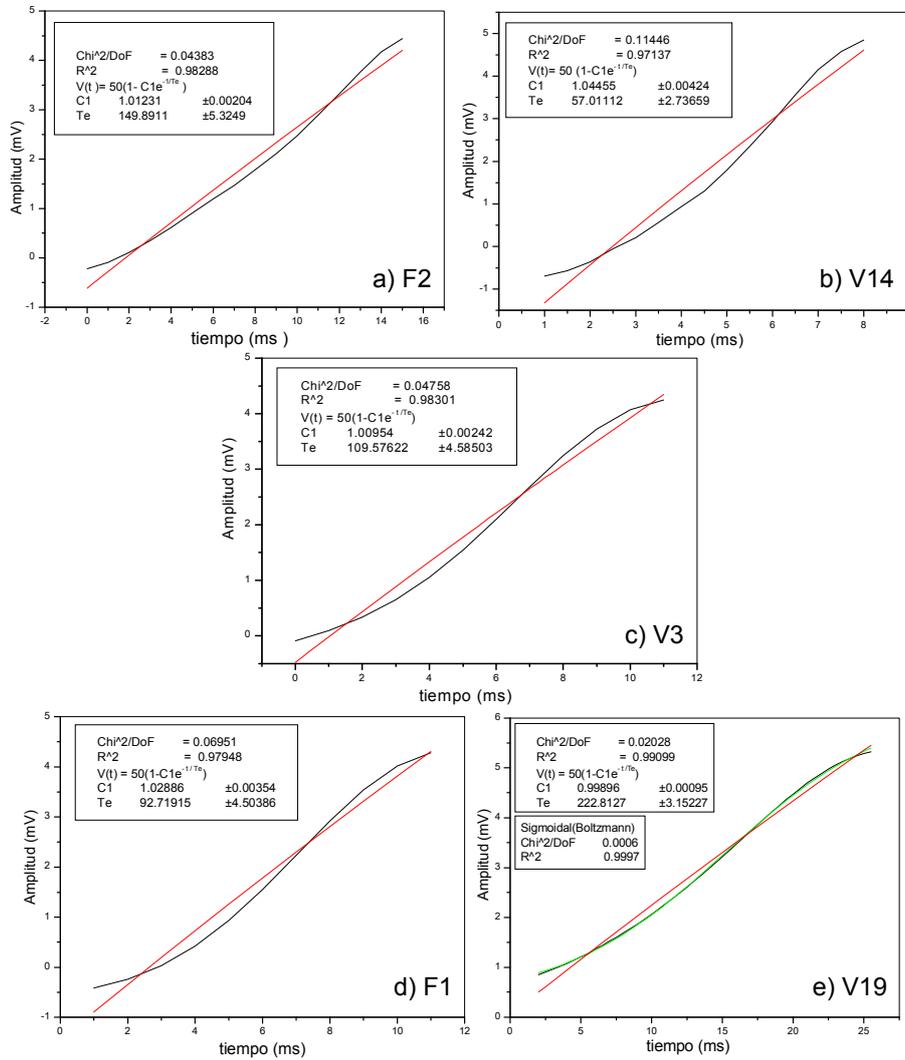


**Figura 6.8.-** En el control, para una despolarización de 20 mV, se produce una corriente de calcio que es completamente inactivada a los 200 ms. Cuando se inyecta EGTA para mantener las concentraciones de calcio intracelular en niveles bajos, se observa un retardo en la inactivación de  $I_{Ca}$ .

v) *Potencial de despolarización,  $V_d(t)$*

En las Figs. 6.9a - e se representan las curvas experimentales (líneas negras) con sus ajustes teóricos (líneas rojas) de la evolución del voltaje de despolarización en el tiempo,  $V_d(t)$  calculada a partir de la ec. (5.37), para cinco neuronas diferentes. Se observa que la función obtenida con el modelo teórico de sección 5.5.4 explica adecuadamente los resultados experimentales obtenidos, excepto en los extremos, como sucede con la fase de repolarización-hiperpolarización del potencial bioeléctrico. En la Fig. 6.9e se muestra además, en verde, el ajuste a una función sigmoideal

DISCUSIÓN Y COMPARACIÓN CON LOS MODELOS TEÓRICOS



**Figura 6.9.-** Neuronas F2, V14, V3, F1 y V19. Se representa la evolución temporal del potencial de despolarización. Las curvas de color negro se obtienen a partir de los datos experimentales y las rojas representan el ajuste a una función exponencial del tipo calculado mediante ec. (5.37). Para la neurona V19 se muestra el “ajuste” sigmoidal a  $V_d(t)$  (línea de trazo verde).

La dependencia temporal calculada, del potencial de despolarización es de la forma,  $V_d(t) = 50(1 - C_1 e^{-t/\tau_{Na}})$ . A partir de la constante  $C_1 = \frac{g_{Na} m_0^3 h_0 \tau_{Na}}{3C_m}$  y tomando del experimento los valores ajustados de  $C_1$  y  $\tau_{Na} = Te$  (dados en Tabla 6.4) y sustituyendo la conductancia de la membrana para el sodio  $g_{Na} = 1.9 \times 10^{-7} m^{-2} \Omega^{-2}$ , la capacidad de la membrana  $C_m = 4 \times 10^{-2} F m^{-2}$  obtenemos los valores de  $m_0^3 h_0$  para las neuronas estudiadas dados en la Tabla 6.4. Los mismos comentarios hechos acerca

de la naturaleza de  $n_0$  se aplicarían a  $m_0^3 h_0$ , en donde aparecen cuatro inductores independientes para la apertura de los canales de sodio, 3 idénticos de apertura (de ahí  $m_0^3$ ) y uno antagonista ( $h_0$ ). No obstante avanzar más en la discusión del origen físico-químico de  $m_0$  y  $h_0$  sería altamente especulativo y no proseguiremos.

**Tabla 6.4.-** Valores de  $m_0^3 h_0$  y  $\tau_{Na}$ , obtenidos del ajuste teórico del potencial de despolarización  $V_d(t)$  para las neuronas estudiadas. Se representa asimismo  $(m_0^3 h_0)^{1/4}$ .

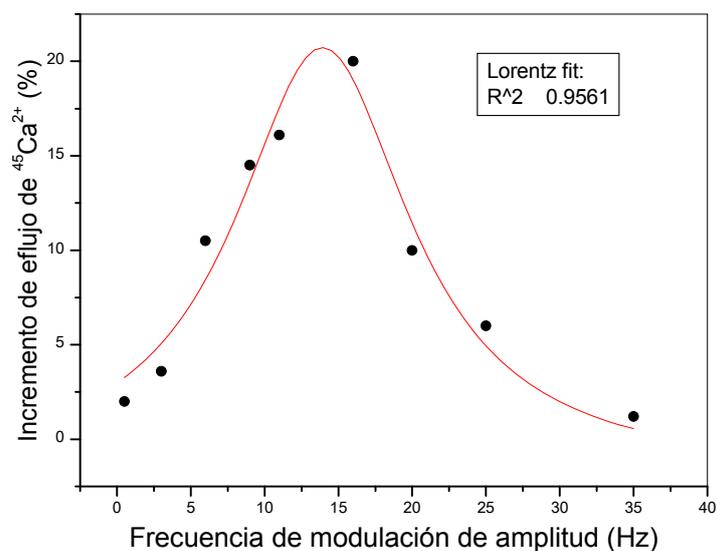
Neurona	$m_0^3 h_0$	$(m_0^3 h_0)^{1/4}$	$\tau_{Na}$ (ms)
F2	$42 \times 10^5$	45	149.9
V14	$110 \times 10^5$	58	57.0
V3	$57 \times 10^5$	49	109.6
F1	$68 \times 10^5$	51	92.7
V19	$28 \times 10^5$	41	222.8

Se observa que los tiempos de relajación para el sodio,  $\tau_{Na}$  son mayores que los del potasio,  $\tau_K$ , aun cuando  $t_s$  sea menor que  $t_b$  (ver Fig. 5.8). Esto se explica debido a que las interrupciones de  $V_d(t)$  y  $V_{th}(t)$  se producen para los potenciales de Nerst del sodio y el potasio, donde  $|V_{Na}| < |V_K|$ . Es decir los  $t_s$  y los  $t_b$  no viene sólo determinados por los tiempos de relajación del sodio y el potasio,  $\tau_{Na}$  y  $\tau_K$ , sino también por  $V_{Na}$  y  $V_K$ .

*vi) Explicación de la ventana en frecuencia para el flujo de calcio en el cerebro de pollo (experimento de Bawin et al., 1978)*

Vamos a probar que el “experimento de Bawin”, cuyo resultado cuyo resultado se muestra en la Fig. 1.5, responde a una dependencia de tipo lorentziana para el flujo de  $^{45}Ca^{2+}$  a través de las membranas celulares de cortes de cerebro de pollo *in vitro*, bajo campo electromagnético de 147 MHz, *modulado* con campo magnético de FEB (0.5 - 35 Hz). Efectivamente en la Fig. 6.10 mostramos el ajuste de la curva experimental (puntos) por una curva lorentziana de HMHW  $\Delta f = 7.2$  Hz y un flujo máximo de 22.6% (curva en rojo). Dado que este experimento marca el *inicio del conocimiento de que son los campos electromagnéticos de muy baja frecuencia (FEB)*

los relevantes en los procesos de efusión de calcio por las membranas celulares, el ajuste conseguido con nuestro modelo HHM podemos catalogarlo de *altamente relevante*. Nótese que ahora es el calcio vertido al medio extracelular el que se mide, por lo que el ajuste conseguido corrobora aún más el modelo HHM. Dentro de nuestro conocimiento este resultado no había sido antes explicado.



**Figura 6.10.-** Los puntos negros son los valores experimentales tomados del experimento de Bawin (Bawin et al., 1978). La curva roja representa el ajuste teórico a una función lorentziana. La calidad del ajuste obtenido corrobora el modelo HHM desarrollado en esta memoria.

## 7.- CONCLUSIONES

### EXPERIMENTALES:

- 1.- Mediante técnicas de inmunocitoquímica, aplicadas a cortes seriados, hemos determinado en *Helix aspersa* que el 100% de las neuronas son positivas para los canales de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> de rectificación retardada. Estos canales están localizados en el soma neuronal y en los axones. Los canales de K<sup>+</sup> activados por calcio intracelular de los tipos SK2 (baja conductancia) y BK<sub>Ca</sub> (alta conductancia) se expresan en el 90% de las neuronas y se localizan en zonas precisas de la membrana. Se ha encontrado reacción positiva para el BK<sub>Ca</sub> en el núcleo de algunas neuronas. Los canales de calcio tipo L se expresan en el 56% de las neuronas, y se observan en el soma y en los axones y núcleos de algunas neuronas. Los canales de calcio tipo P/Q y N son positivos en el 7% de las neuronas y están localizados indistintamente en las membranas del soma neuronal y en los axones.
- 2.- Existe una marcada correspondencia entre los tipos de canales que expresa la neurona F1 y la actividad electrofisiológica, típicamente dependiente del calcio, que se observa bajo la acción de campo magnético de frecuencia extremadamente baja (FEB) en el rango de 0.1 a 20 Hz.
- 3.- Hay una aceptable concordancia entre los tipos de canales iónicos que expresan las neuronas y el tipo de actividad electrofisiológica inducida bajo exposición a campo magnético de FEB en el rango de 0.1 a 217 Hz.
- 4.- El 82% de las neuronas estudiadas en los ganglios cerebroideos de *Helix aspersa* son magnetosensibles, mientras que el 18% de las neuronas no responde al campo magnético de FEB, al menos bajo nuestras condiciones de experimentación.
- 5.- Bajo exposición a un campo magnético de FEB se observan rangos de frecuencia para los cuales la respuesta neuronal es máxima (0.1 - 5 Hz).

- 6.- Para valores de frecuencia del campo magnético aplicado próximos a la frecuencia natural o espontánea de la neurona (0.1 - 5 Hz) se observa un efecto de tipo resonante en frecuencia, consistente en un máximo de frecuencia de disparo para las frecuencias del campo magnético aplicado.
- 7.- La reversibilidad observada del efecto inducido, sugiere que las modificaciones de la actividad bioeléctrica, producidas por el campo magnético de FEB, son funcionales y no estructurales.
- 8.- El campo magnético de frecuencia extremadamente baja induce modificaciones en la amplitud de los potenciales.
- 9.- Los cambios bruscos en el patrón de respuesta observado, para temperaturas cercanas a las de las transiciones de fase de los cristales líquidos de los lípidos de la membrana, son similares a los observados para las frecuencias de resonancia. Resaltamos que las transiciones observadas son *in vitro*.

### TEÓRICAS:

- 10.- Se ha desarrollado un modelo teórico (denominado *modelo HHM*), que explica la variación temporal del impulso bioeléctrico espontáneo, basado en una ampliación del modelo de Hodgkin-Huxley (modelo HH), mediante la introducción de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica inducida por el campo magnético alterno, debido al superdiamagnetismo de los fosfolípidos de membrana y de la explosión coulombiana del  $\text{Ca}^{2+}$  desde sus receptores de membrana (modelo del Moral y Azanza).
- 11.- Nuestro modelo HHM presenta la novedad de tratar la membrana mediante un nudo de Kirchoff, en lugar de hacerlo mediante el modo usual de ramas de Kirchoff en paralelo. Ello permite la introducción explícita de la capacidad de la membrana en el cálculo de los voltajes de membrana.

- 12.- Para el proceso de repolarización-hiperpolarización, la función de tipo exponencial obtenida, concuerda adecuadamente con el experimento. La función de tipo exponencial es el resultado de haber utilizado la aproximación del tiempo de relajación para la función de Hodgkin - Huxley  $n(t)$ , responsable de la apertura de los canales de  $K^+$ . Se han obtenido así los valores del tiempo de relajación de los canales de  $K^+$ ,  $\tau_{rh}$ , para un conjunto de neuronas y los valores iniciales  $n_0$ .
- 13.- Nuestro modelo HHM predice una variación prácticamente nula de  $\tau_{rh}$  con el campo magnético alterno aplicado, en excelente concordancia con la nula variación observada del tiempo de bajada de la repolarización-hiperpolarización,  $t_b$ , bajo campo magnético alterno aplicado.
- 14.- El modelo propuesto predice un espectro en frecuencia de tipo *lorentziano* para la parte del impulso bioeléctrico individual, correspondiente a la repolarización-hiperpolarización, en excelente concordancia con el espectro de frecuencia obtenido experimentalmente, por análisis de Fourier del impulso.
- 15.- El modelo HHM predice una dependencia con función *lorentziana* de la frecuencia de disparo de la neurona,  $f$ , con la frecuencia del campo magnético aplicado,  $f_M$ , en excelente acuerdo con la dependencia  $f(f_M)$  experimental, para un conjunto de neuronas. Por tanto la dependencia lorentziana explica la resonancia en frecuencia observada. De la semianchura de la lorentziana se obtienen valores medios del número de fosfolípidos por clúster,  $N_c$ , para diversas neuronas, con valores consistentes con los obtenidos a partir de la variación de  $f$  con campo magnético estático y a partir de la medida de la susceptibilidad magnética perpendicular de los fosfolípidos,  $\chi_{\perp}$  en membranas de eritrocitos (Azanza y del Moral, 1994).

- 16.- El modelo HHM explica la variación temporal del voltaje de despolarización, mediante una dependencia de tipo exponencial. De la comparación con el experimento realizado en diversas neuronas se obtienen: el tiempo de relajación de dicho proceso,  $\tau_{Na}$ , correspondiente a los canales de sodio; el valor inicial  $m_0^3 h_0$  de la función  $m^3(t)h(t)$  de Hodgkin-Huxley, responsable de la apertura de los canales de sodio.
- 17.- El modelo HHM explica bien, por primera vez, el “experimento de la *ventana* de Bawin et al.” de efusión de  $^{45}Ca^{2+}$  extracelular en cerebros de pollo, bajo campo electromagnético (147 MHz) modulado por campo magnético de FEB (0.5 - 35 Hz), dado que la dependencia con la baja frecuencia del flujo de  $Ca^{2+}$  se ajusta bien a una curva lorentziana.

## CONCLUSIONS

### EXPERIMENTAL:

- 1.- Immunocytochemistry results from seriated tissue sections of *Helix aspersa* brain ganglia show that about the 100% neurons are positive for voltage-gated- $\text{Na}^+$  and voltage-gated-delayed-rectifier- $\text{K}^+$ -channels. The intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent- $\text{K}^+$ -channels, SK2-small conductance and  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -maxi-conductance types, are expressed in about the 90% of neurons being localized in membrane sites. Positive reaction for  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  has been found in the nuclei of some neurons. The 56% of neurons express calcium voltage-gated-channels of L-type which are observed in neuron soma, axons and the nuclei of some neurons. The protein expression decreases to about 7% for the P/Q and N-type calcium channels.
- 2.- There exists a good correspondence between the kind of channels expressed by the neuron F1 and the exhibited electrophysiological activity, typically calcium dependent, induced under applied extremely-low-frequency magnetic fields (ELF-MF) in the range of 0.1 - 20 Hz.
- 3.- There exists an acceptable concordance between the kind of ionic channels expressed by neurons and the kind of electrophysiological activity exhibited under applied ELF-MF in the range of 0.1 - 217 Hz.
- 4.- The 82% of studied neurons from *Helix aspersa* brain ganglia show sensitivity to the applied magnetic fields (magnetosensitivity). The 18% neurons do not give any response to de applied ELF-MF under our experimental conditions.
- 5.- Under exposure to applied ELF-MF it has been observed a range of frequencies for maximum neuron response (0.1 - 5 Hz).
- 6.- For frequency values of applied ELF-MF, next to the spontaneous frequency of neurons bioelectric activity (0.1 - 5 Hz), it has been observed a kind of *frequency-resonance* effect. Such an effect is characterized by a maximum of the neuron firing frequency under applied MF.

- 7.- The reversibility of the induced effect under applied ELF-MF suggests that the induced modifications are not structural but functional.
- 8.- The ELF-MF induce modifications of the bioelectric potentials amplitude.
- 9.- The observed sudden modifications of the neurons bioelectric activity for temperatures near to that of the phase transitions of the membrane lipid liquid crystal are similar to the ones observed for the resonance frequencies. It is to be emphasized that the observed transitions are *in vitro*.

### **THEORETICAL:**

- 10.- We have developed a theoretical model (so called *HHM model*), which explains the time evolution of the spontaneous bioelectric impulse, based on an extension of the Hodgkin-Huxley (HH model), through the introduction of the  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolic current induced by the applied magnetic field. This current is due to the combined superdiamagnetism shown by the membrane phospholipids and the  $\text{Ca}^{2+}$  coulomb explosion from their membrane receptors (del Moral & Azanza model).
- 11.- Our HHM model presents the novelty of treating the membrane as a Kirchoff knot instead of doing that using the usual way of treating the membrane through Kirchoff branches in parallel. That allows the explicit introduction of the membrane capacitance in the membrane voltage calculations.
- 12.- For the repolarization-hyperpolarization process, the obtained exponential function agrees properly with experiment. The exponential dependence is the result of using the relaxation time approximation for the HH  $n(t)$  function, responsible for the opening of the  $\text{K}^+$  channels. In this way we have obtained the  $\text{K}^+$  relaxation time,  $\tau_{rh}$  values, for a set of neurons, and the initial values,  $n_0$ .
- 13.- Our HHM model predicts an almost null variation of  $\tau_{rh}$  with applied AC magnetic field, in good agreement with the observed invariance of the going down time,  $t_b$  for the repolarization-hyperpolarization under applied AC magnetic field.

- 14.- The proposed model predicts a *Lorentzian* frequency spectrum for the single bioelectric impulse part corresponding to the repolarization-hyperpolarization, in excellent agreement with the frequency spectrum obtained from a Fourier analysis of the observed impulse.
- 15.- The HHM model predicts a *Lorentzian* dependence of the neuron shot frequency,  $f$  with the applied magnetic field one,  $f_M$ , in excellent agreement with the experimental  $f(f_M)$  variation for a set of neurons. Therefore the Lorentzian dependence explains the resonance in frequency observed. From the Lorentzian half-width we have obtained the average values for the phospholipid cluster number,  $N_c$  for the different neurons studied. The values are consistent with the obtained ones from the  $f(B)$  variation under static magnetic field,  $B$  and from the phospholipid perpendicular magnetic susceptibility,  $\chi_{\perp}$  measured in erythrocyte membranes (Azanza and del Moral, 1994).
- 16.- The HHM model explains the depolarization voltage time dependence, through an exponential time increase. From the comparison with the experiments performed in a set of different neurons we obtain: the relaxation time for the process,  $\tau_{Na}$  corresponding to the sodium channels; the initial value,  $m_0^3 h_0$  of the HH function  $m^3(t)h(t)$ , responsible for the sodium channels opening.
- 17.- The HHM model explains well, by the first time, the “Bawin et al. frequency window experiment” of extracellular  $^{45}Ca^{2+}$  effusion in chicken brain, under electromagnetic field (147 MHz) modulated by ELF magnetic field (0.5 - 30 Hz), because the  $^{45}Ca^{2+}$  flux ELF dependence is well adjusted by a Lorentzian curve.

## 8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adey WR. Tissues interactions with non-ionizing electromagnetic fields. *Phys Rev* 1981; 61: 435-513.

Adey WR. Biological effects of radio frequency electromagnetic radiaton. En: Lin JC. *Electromagnetic Interaction with Biological Systems*. New York: Plenum Press; 1989. p. 109-140.

Adlkofer F. Summary of the findings obtained in the Reflex Project and future perspectives. The Bioelectromagnetics Society 25<sup>th</sup> Annual Meeting 2003. June 22-27 Wailea, Maui.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. New York and London; 2002.

Aldinucci C, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F et. al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the physiologic behaviour of a human astrocitoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1499: 101-108.

Ayrapetyan SN, Hunanyan AS, Hakobyan SN. 4 Hz EMF Treated Physiological Solution Depresses Ach-Induced Neuromembrane Current. *Bioelectromagnetics* 2004; 25:397-399.

Azanza MJ, del Moral A. Effects of static magnetic fields on isolated neurons. *J Phys* 1988; 12: 49-50.

Azanza MJ, Rassi D. Evaluation of biogenic magnetite in bees and snails. *Proc. Intermag '90 Conference, BC-06, 1990. Magnetics Conference, 1990. 1990 Digests of INTERMAG '90. International 17-20 April 1990: BC-06.*

Azanza MJ. Characterization of neuronal membrane K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels operated under steady magnetic fields exposure. *J Magn Magn Mat* 1990; 83: 527-529.

Azanza MJ. The molecular basis of neuronal magnetosensitivity. *Trends in Comparat Biochem Physiol* 1993; 1: 1083-1098.

Azanza MJ, del Moral A. Dependencia de la frecuencia de la actividad neuronal con la intensidad de campo magnético estático. *Avances en Bioelectromagnetismo* 1993; Alcalá de Henares. Madrid: 127-138.

Azanza MJ, del Moral A. Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog Neurobiol* 1994; 44: 517-601.

Azanza MJ, del Moral A. Neuron firing frequency dependence on the static magnetic field intensity. *J Magn Magn Mat* 1995; 140-144: 1464-1465.

Azanza MJ, del Moral A. Isolated neuron amplitude spike decrease under static magnetic fields. *J Magn Magn Mat* 1996; 157-158: 593-594.

Azanza MJ, del Moral A. FEB-magnetic field induced effects on the bioelectric activity of single neurone cells. *J Magn Magn Mat* 1998; 177-178: 1451-1452.

Azanza MJ, Calvo AC. Snail neuron bioelectric activity induced under static or sinusoidal magnetic fields reproduces mammal neuron responses under transcranial magnetic stimulation. *Electro and Magnetobiology* 2000; 19: 303-319.

Azanza MJ, Pérez Bruzón RN, Lederer D, Calvo AC, del Moral A. Reversibility of the effects induced on the spontaneous bioelectric activity of neurons under exposure to 8.3 and 217 Hz low intensity magnetic fields. En: Kostarakis P. 2<sup>nd</sup> International Workshop: Biological effects of EMFs. Rhodes: Greece; 2002a. 651-659.

Azanza MJ, Calvo AC, del Moral A. Evidence of synchronization of neurones activity of molluscan brain ganglía induced by alternating 50 Hz applied magnetic field. *Electro and Magnetobiology* 2002b; 21: 221-232.

Azanza MJ, Raso MP, Pérez Bruzón RN, Junquera C, Maestú C, Aisa J, Lahoz M, Pérez Castejón C, Martínez Ciriano C, Vera Gil A, del Moral A. Characterization of connexins in neuron submitted to applied EMF. *BioEMS*. Dublín: Ireland; 2005a. 511-514.

Azanza MJ, Pérez Bruzón RN, Calvo AC, del Moral A. Elemental neuron network dynamics under applied sinusoidal magnetic fields. *BioEMS*. Dublín: Ireland; 2005b. 312-314.

Azanza MJ, Pérez Bruzón RN, Calvo AC, del Moral A. Neurone bioelectric activity under magnetic fields of variable frequency in the range of human EEG, reveals a frequency window effect. Remitido para publicar, 2005.

Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ. Three-dimensional structure of calmodulin. *Nature* 1985; 315: 37-40.

Bauréus Koch CLM, Sommarin M, Persson BRR, Salford LG, Eberhardt JL. Interaction Between Weak Low Frequency Magnetic Fields and Cell Membranes. *Bioelectromagnetics* 2003; 24: 395-402.

Bawin SM, Kaczmarek LK, Adey WR. Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 1975; 247: 74-81.

Bawin SM, Adey WR. Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequencies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1999-2010.

Bawin SM, Adey WR. Calcium binding on cerebral tissue. En: Hazzard DG. Symposium on Biological Effect and Measurement of Radio Frequency/Microwaves. Rockville, MD; 1977. p. 305-313.

Bawin SM, Adey WR, Sabott IM. Ionic factors in release of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  from chicken cerebral tissue by electromagnetic fields. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 6314-6318.

Bell GB, Marino AA, Chesson AL. Frequency specific responses in the human brain caused by electromagnetic fields. *J Neurol Sci* 1994; 123: 26-32.

Beason RC, Semm P. Responses of neurons to an amplitude modulated microwave stimulus. *Neuroscience Letters* 2002; 333: 175-178.

Bernardi P, D'Inzeo G, Eusebi F. Response of a neuronal membrane to applied sinusoidal currents. *Cell Biophys* 1985; 7: 185-195.

Berridge MJ, Galione A. Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J* 1988; 2: 3074-3082.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Cell Biol* 2000; 1: 11-21.

Blackman CF, Benane SG, Kinney LS, Joines WT, House DE. Effects of FEB fields on calcium-ion efflux from brain tissue *in vitro*. *Radiat Res* 1982; 92: 510-520.

Blackman CF, Benane SG, Kinney LS, Joines WT, House DE. A role for the magnetic field in the radiation-induced efflux of calcium ions from brain tissue *in vitro*. *Bioelectromagnetics* 1985a; 6: 327-337.

Blackman CF, Benane SG, House DE, Joines WT. Effects of FEB (1-120 Hz) and modulate (50 Hz) RF fields on the efflux of calcium ions from brain tissue *in vitro*. *Bioelectromagnetics* 1985b; 6: 1-11.

Blackman CF, Benane SG, House DE, Elliot DJ. Importance of alignment between local DC magnetic field and an oscillating magnetic field in response of brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *Bioelectromagnetics* 1990; 11: 159-167.

Blackman CF, Benane SG, House DE. The influence of temperature during electric- and magnetic field-induced alteration of calcium-ion release from *in vitro* brain tissue. *Bioelectromagnetics* 1991; 12: 173-182.

Blakemore RP. Magnetotactic bacteria. *Science* 1975; 190: 377-379.

Calvo AC, Azanza MJ. Electrophysiological responses of snail neurons under applied 50 Hz alternating magnetic fields. *Electro and Magnetobiol* 1999a; 18: 305-312.

Calvo AC, Azanza MJ. Synaptic neuron activity under applied 50 Hz alternating magnetic fields. *Comp Biochem Physiol* 1999b; 124: 99-107.

Chaikin PM, Lubensky TC. *Principles of Condensed Matter Physics*. Cambridge Univ Press: New York; 1995.

Chiabrera A, Bianco B. The role of magnetic field on the EM interaction with ligand binding. En: Blank M, Findl E. *Mechanisms Approaches to Interaction of Electromagnetic Fields with Living Systems*. New York: Plenum Press; 1987. p. 79-107.

- Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-1276.
- Clay JR. Axonal excitability revisited. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 88: 59-90.
- Cridland NA, Haylock RGE, Saunders RD. 50 Hz magnetic field exposure alters onset of S-Phase in normal human fibroblast. *Bioelectromagnetics* 1999; 20: 446-452.
- Danilov VI, Parsmintsev V V, Trofimova OI, Turkin V V, Shvanevan B. About reversible effect of the changing in time magnetic field of mollusc neurons. *Biofizika* 1986; 31: 838-841.
- del Moral A, Azanza MJ. Model for the effect of static magnetic fields on isolated neurons. *J Magn Magn Mat* 1992; 114: 240-242.
- del Moral A, Azanza MJ, Calvo AC, Pérez Bruzón RN. Cooperative diamagnetism and  $Ca^{2+}$  liberation of plasma membrane molecules explains the neuron responses to applied static and extremely low frequency magnetic fields. En: Kostarakis P. 2<sup>nd</sup> International Workshop: Biological effects of EMFs. Rhodes: Greece; 2002. 298-308.
- del Moral A, Pérez Bruzón RN, Azanza MJ. The Hodgkin-Huxley equation under magnetic field (para publicar, 2006a).
- del Moral A, Pérez Bruzón RN, Azanza MJ. A model explaining frequency resonance effects induced by ELF magnetic fields on neurons (para publicar, 2006b).
- de Pomerai D, Daniells C, David H, Allan J, Duce I, Murwakil M et. al. Non-thermal heat-shock response to microwaves. *Nature* 2000; 405: 417-418.
- Eckert R, Tillotson DL. Calcium - mediated inactivation of the calcium conductance in caesium - loaded giant neurones of *Aplysia californica*. *J Physiol* 1981; 314: 265-280.
- Fitzsimmons RJ, Baylink DJ, Ryaby JT, Magee F. EMF-stimulated bone-cell proliferation. En: BlanK M. *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*. San Francisco: San Francisco Press; 1993. p. 899-902.
- Fuller M, Wilson CL, Velasco AL, Dunn JR, Zoeger J. On the confirmation of an effect of magnetic fields on the interictal firing rate of epileptic patients. *Brain Res Bull* 2003; 60: 43-52.
- Galvanovskis J, Sandblom JS, Berqvist I, Hamnerius Y. Cytoplasmic ELF magnetic field stimulates intracellular  $Ca^{2+}$  oscillations. *Proceedings of the Sixteenth Annual Meeting of the Bioelectrochemistry Society* 1999; 90.
- Galvanovskis J, Sandblom JS, Berqvist B, Galt S, Hamnerius Y. Cytoplasmic  $Ca^{2+}$  oscillations in human leukaemia T-cells are reduced by 50 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1999; 20: 269-276.
- Ghione S, Del Seppia C, Mezzasalma L, Emdin M, Luschi P. Human Head Exposure to a 37 Hz Electromagnetic Field: Effects on Blood Pressure, Somatosensory Perception, and Related Parameters. *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 167-175.

Goodman EM, Greenebaum B, Marron MT. Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *Int. Rev. Cytol* 1995; 158: 279-338.

Gundersen R, Greenebaum B, Schaller M. Intracellular recording during magnetic field application to monitor neurotransmitter release events: Methods and preliminary results. *Bioelectromagnetics* 1986; 7: 271-281.

Hemmersbach R, Becker E, Stockem W. Influence of extremely low frequency magnetic fields on the swimming behaviour of ciliates. *Bioelectromagnetics* 1997; 18: 491-497.

Hernádi L, Elekes K. Topographic organization of serotonergic and dopaminergic neurons in the cerebral ganglia and their peripheral projection patterns in the dead areas of the snail *Helix pomatia*. *J Comp Neurol* 1999; 411: 274-287.

Hille B. Ion channels of excitable membranes. 2<sup>a</sup> ed. Sunderland Massachusetts: Sinauer Assoc; 2001.

Hirsch HR. Squid giant axon: repetitive responses to alternating current stimulation. *Nature* 1965; 18: 1218-1219.

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology* 1952; 117: 500-544.

Hogan MV, Wieraszko A. An increase in cAMP concentration in mouse hippocampal slices exposed to low-frequency and pulsed magnetic fields. *Neurosci Lett* 2004; 366: 43-47.

Ivancsits S, Diem E, Pilger A, Rüdiger HW, Jahn O. Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 2002; 519: 1-13.

Joan NA. Morphology of nonmammalian glial cells: functional implications. En: Kettenmann H, Ranson BR. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press; 1995. p. 97-116.

Kaiser F. Non-linear Electrodynamics in Biological Systems. En: Adey WR, Lawrence AF. *New York: Plenum Press; 1984. p. 393-395.*

Kavaliers M, Ossenkopp KP. Magnetic field inhibition of morphine-induced analgesia and behavioral activity in mice: Evidence for involvement of calcium. *Brain Res* 1986; 379: 30-38.

Kerkut GA, Lambert JDC, Gayton RJ, Loker JE, Walker RJ. Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa* neurons. *Comp Biochem Physiol* 1975; 50A: 1-25.

Kerkut GA, York B. *The electrogenic sodium pump*. Ed. Scientecnica, Bristol, 1971.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principios de Neurociencia*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2001.

- Kirschvink JL, Kirschvink A, Diaz-Ricci JC, Kirschvink SJ. Magnetite in human tissues: A mechanism for the biological effects of weak ELF magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1992; Suppl. 1: 101-103.
- Koludov F, Chernysheva ON. Special features of carbohydrate-energy and nitrogen metabolism in the rat brain under the influence of magnetic fields of commercial frequency. *Ukr Biokhim Zh Kiev* 1980; 3: 229-231.
- Korzh-Sleptova IL, Lindström E, Hansson Mild K, Berglund A, Lundgren E. Low frequency magnetic fields increased inositol 1, 4, 5 triphosphate in the Jurkat cell lines. *FEBS Letters* 1995; 359: 151-154.
- Lawrence AF, Adey WR. Non-linear wave mechanism in interaction between excitable tissue and electromagnetic fields. *Neurol Res* 1982; 4: 115-126.
- Lee BCh, Johng HM, Lim JK, Jeong JH, Baik KY, Nam TJ et. al. Effects of extremely low frequency magnetic field on the antioxidant defense system in mouse brain: a chemiluminescence study. *J Photochem Photobiol B* 2004; 73: 43-48.
- Lee JH, McLeod KJ. Morphologic Responses of Osteoblast-like Cells in Monolayer Culture to ELF Electromagnetic Fields. *Bioelectromagnetics* 2000; 21: 129-136.
- Li CM, Chiang H, Fu YD, Shao BJ, Shi JR, Yao GD. Effects of 50 Hz magnetic fields on gap junctional intercellular communication. *Bioelectromagnetics* 1999; 20: 290-294.
- Liboff AR. Geomagnetic cyclotron resonance in living cells. *Cell Biol Phys* 1985; 13: 99-102.
- Liboff AR, Smith SD, McLeod BR. Experimental evidence for ion cyclotron resonance mediation of membrane transport. En: Blank M, Findl E. *Mechanisms Approaches to Interaction of Electromagnetic Fields with Living Systems*. New York: Plenum Press; 1987. p. 109-132.
- Liboff AR, McLeod BR. Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1988; 9: 39-51.
- Liburdy RP. Calcium signalling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channels. *FEBS Letters* 1993; 301: 53-59.
- Lindsay KA, Rosenberg JR, Tucker G. A note on the discrepancy between the predicted and observed speed of the propagated action potential in the squid giant axon. *J Theor Biol* 2004; 230: 39-40.
- Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH, Lundgren E. Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. *J Cell Physiol* 1993; 156: 395-398.
- Lin-Liu S, Adey WR. Low frequency amplitude-modulated microwave fields change calcium efflux rates from synaptosomes. *Bioelectromagnetics* 1982; 3: 309-322.

Lisman JE. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 1997; 20: 38-43.

Łopucki M, Czekierdowski A, Rogowska W, Kotarski J. The Effect of Oscillating Low Intensity Magnetic Field on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, and Mg<sup>++</sup> Concentrations in the Maternal and Fetal Circulation of the Dually Perfused Human Placental Cotyledon. *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 329-337.

Lyle DB, Wang XH, Ayotte RD, Sheppard AR, Adey WR. Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 1991; 12: 145-56.

Macdonald AG. The adaptation of excitable membranes to temperature and pressure: conduction velocity. En: Cossins AR. *Temperature Adaptation of Biological Membranes*. London. Portland Press; 1994. p. 205-221.

McElhaney RN. Techniques for measuring lipid phase state and fluidity in biological membranes. En: Cossins AR. *Temperature Adaptation of Biological Membranes*. London. Portland Press; 1994. p. 31-48.

Macias MY, Battocletti JH, Sutton CH, Pintar FA, Maiman DJ. Directed and enhanced neurite growth with pulsed magnetic field stimulation. *Bioelectromagnetics* 2000; 21: 272-286.

Madec F, Billaudel B, Charlet de Sauvage R, Sartor P, Veyret B. Effects of FEB and static magnetic fields on calcium oscillations in islets of Langerhans. *Bioelectrochemistry* 2003; 60: 73-80.

Maestú C. Comunicación personal, 2005.

Maestú C, Pérez Bruzón RN, Azanza MJ, Robin A, del Moral A. Neuron dynamics induced by alternating magnetic fields of nT in the range of 7.5 - 8.5 Hz (para publicar, 2006).

Mahrour N, Pologea-Moraru R, Moiescu MG, Orłowski S, Levêque Ph, Mir LM. In vitro increase of the fluid-phase endocytosis induced by pulsed radiofrequency electromagnetic fields: importance of the electric field component. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1668: 126-137.

Manni V, Lisi A, Rieti S, Serafino A, Ledda M, Giuliani L et. al. Low Electromagnetic Field (50 Hz) Induces Differentiation on Primary Human Oral Keratinocytes (HOK). *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 118-126.

Markov MS, Wang S, Pilla AA. Effects of weak low frequency sinusoidal and DC magnetic fields on myosin phosphorylation in a cell-free preparation. *Bioelectrochem and Bioenerg* 1993; 30:119-125.

Mathews CK, van Holde KE, Arhen KG. *Bioquímica*. 3ª ed. Madrid: Prentice Hall-Pearson Educación; 2002.

Mathie A, Kennard LE, Veale EL. Neuronal ion channels and their sensitivity to extremely low frequency weak electric field effects. *Radiation Protection Dosimetry* 2003; 106: 311-315.

Mayer ML, Westbrook GL. Cellular mechanisms underlying excitotoxicity. *TINS* 1987; 10: 59-61.

Nordenson I, Mild KH, Järventaus H, Hirvonen A, Sandström M, Wilén J et. al. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of train engine drivers. *Bioelectromagnetics* 2001; 22: 306-315.

Obo M, Konishi Sh, Otaka Y, Kitamura S. Effect of Magnetic Field Exposure on Calcium Channel Currents Using Patch Technique. *Bioelectromagnetics* 2002; 23: 306-314.

Oda T, Koike T. Magnetic field exposure saves rat cerebellar granule neurons from apoptosis in vitro. *Neurosci Lett* 2004; 365: 83-86.

Olivares-Bañuelos T, Navarro L, González A, Drucker-Colin R. Differentiation of chromaffin cells elicited by FEB MF modifies gene expression pattern. *Cell Biol Int* 2004; 28: 273-279.

Pentreath V W, Pennington AJ. Coupling of energy metabolism between neurons and glial cell in leech ganglia. *J. Physiol* 1987; 82: 218-228.

Pérez Bruzón RN, Azanza MJ, Calvo AC, del Moral A. Neurona bioelectric activity under magnetic fields of variable frequency in the range of 0.1-80 Hz. *J Magn Magn Mat* 2004; 272-276: 2424-2425.

Pérez Bruzón RN, Azanza MJ, Lederer D, Calvo AC, del Moral A, Van der Vost. Modification of neurons spontaneous activity under exposure to sinusoidal magnetic fields of 8.3 and 217 Hz. Remitido para publicación, 2005.

Perry A, Bauer GB, Dizon AE. Magnetoreception and biomineralization of magnetite in magnetic amphibians and reptiles. En: Kirschvink JL, Jones DS, MacFadden BJ. *A New Biomagnetism*. New York: Plenum Press; 1985. p. 439-453.

Pessina GP, Aldinucci C, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A et. al. Pulsed electromagnetic fields affect the intracellular calcium concentrations in human astrocytoma cells. *Bioelectromagnetics* 2001; 22: 503-510.

Pienkowski D, Pollack SR, Brighton CT, Griffith NJ. Comparison of asymmetrical and symmetrical pulse waveforms in electromagnetic stimulation. *J Orthopaedic Res* 1992; 10: 247-255.

Radojcic T, Pentreath V W. Invertebrate glia. *Prog Neurobiol* 1979; 12: 115-179.

Ramundo-Orlando A, Serafino A, Schiavo R, Liberti M, d'Inzeo G. Permeability changes of connexin32 hemi channels reconstituted in liposomes induced by extremely low frequency, low amplitude magnetic fields. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1668: 33-40.

Ravera S, Repaci E, Morelli A, Pepe IM, Botter R, Beruto D. Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Field on the Adenylate Kinase Activity of Rod Outer Segment of Bovine Retina. *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 545-551.

Robinson JG, Pendleton AR, Monson KO, Murray BK, O'neill KL. Decreased DNA repair rates and protection from heat induced apoptosis mediated by EMF-exposure. *Bioelectromagnetics* 2002; 23: 106-112.

Romijn H. About the origin of consciousness. A new, multidisciplinary perspective on the relationship between brain and mind. *Proc Kon Ned Akad V Wetensch* 1997; 100: 181-267.

Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *TINS* 1987; 10: 299-302.

Shah JP, Midkiff P, Brandt PC, Siskin BF. Growth and Differentiation of PC6 Cells: the Effects of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF). *Bioelectromagnetics* 2001; 22: 267-271.

Siegel M, Marder E, Abbott LF. Activity-dependent current distributions in model neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11308-11312.

Sinkó M, Kriehber DG, Weiss DG, Luben RA. Effects of 50 Hz exposure on micronucleous formation and apoptosis in transformed and nontransformed human cell lines. *Bioelectromagnetics* 1998; 19: 85-91.

Steriade M, Contreras D, Amzica F. Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments. *Trends Neurosci* 1994; 17: 199-208.

Straume A, Oftedal G, Johnsson A. Skin temperature increase caused by a mobile phone: a methodological infrared camera study. *Bioelectromagnetics* 2005; 26: 510-519.

Tenforde TS. Biological interactions of extremely low frequency electric and magnetic fields. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 1991; 25: 1-17.

Toroptsev IV, Garganeyev GP, Goshenina TI, Teplayakova NL. Patholoanatomic characteristics of changes in experimental animals under the influence of magnetic fields. En: Kholodov YA. *Influence of Magnetic Fields on Biological Objects*. Virginia: Springfield Ntis Rep No JPRS 63038; 1974. p. 95-97.

Tritsch D, Marchais-Chesnoy D, Feltz A. *Physiologie du neurone*. 2ª ed. Paris: Doin; 1998.

Úbeda A, Trillo MA. Radiaciones RF de antenas de telefonía y salud pública: el estado de la cuestión. *Radioprotección* 1999; 20: 24-36.

Ueno S, Lovsund P, Ake Oberg P. Effect of time-varying magnetic fields on the action potential in lobster giant axon. *Med Biol Eng Comput* 1986; 24: 521-526.

Volpe P, Parasassi T, Esposito C, Ravagnan G, Giusti AM, Pasquarelli A et. al. Cell membrane lipid molecular dynamics in a solenoid versus a magnetically shielded room. *Bioelectromagnetics* 1998; 19: 107-111.

Volpe P. Interactions of zero-frequency and oscillating magnetic fields with biostructures and biosystems. *Photochem Photobiol Sci* 2003; 2: 637-648.

Voogd J, Glickstein M. The anatomy of the cerebellum. *Trends in Neurosci* 1998; 21: 370-375.

Walker RJ, Piggott SM, Kerkut GA. Studies on amino acid receptors of *Helix aspersa* neurones. *Neurobiol Invertebrates Gastropoda Brain* 1976; Tihany: 221-238.

Wellens Th, Shatokhin V, Buchleitner A. Stochastic resonance. *Rep Prog Phys* 2004; 67: 45-105.

Yoshizawa H, Tsuchiya T, Mizoe H, Ozcki H, Kanao S, Yomari H et. al. No effect of FEB-MF observed on cell growth or initial response of cell proliferation in human cancer cell lines. *Bioelectromagnetics* 2002; 23: 355-368.

Yost MG, Liburdy RP. Time varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte. *FEBS Letters* 1992; 296: 117-122.

Yu Y, Liu F, Wang J, Wang W. Spike timing precision for a neuronal array with periodic signal. *Phys Lett A* 2001; 282: 23-30.

Zetterberg LA, Grawé J. Extended exposure of adult and fetal mice to 50 Hz does not increase the incidence of micronuclei in erythrocytes. *Bioelectromagnetics* 2001; 22: 351-357.

Zhang Y, Ding J, Duan W, Fan W. Influence of pulsed electromagnetic field with different pulse duty cycles on neurite outgrowth in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Bioelectromagnetics* 2005; 26: 406-411.

Zhou J, Li C, Yao G, Chiang H, Chang Z. Gene expression of cytokine receptors in HL60 cells exposed to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 2002; 23: 339-346.

Zoeger J, Dunn JR, Fuller M. Magnetic Material in the dead of the common Pacific dolphin. *Science* 1981; 213: 892-894.