



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

*“Efecto de diferentes frecuencias e intensidades de campos magnéticos
sobre cultivos primarios de células cromafines”*

Tesis que presenta

Hugo Cruces Solís

Para obtener el título de

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

Directora de Tesis

Dra. Leticia Verdugo Díaz

México, D.F.

Septiembre del 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mis padres y mi hermana por su apoyo incondicional, su paciencia, su amor
inmensos y por respetar desde siempre mis decisiones.*

*A la Dra. Verdugo por su sencillez, su motivación y ayuda constantes, pero
sobre todo, por entender mi condición humana.*

*A todos mis amigos que me rodean y, a través de las experiencias compartidas,
fueron parte de este proceso*

...arrieros somos y en el camino andamos.

Cuco Sánchez

A su manera humilde, el hombre imitaba las tareas de la Divina Providencia.

IB Singer

*...a la vida le había sido concedido un don que implicaba, al mismo tiempo, un
obstáculo para alcanzar la felicidad: la libertad.*

IB Singer

TABLA DE CONTENIDOS.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Campos Magnéticos.....	1
1.1.1 Antecedentes históricos.	1
1.1.2 Propiedades de los campos electromagnéticos.....	5
1.1.3 Campos electromagnéticos y sistemas biológicos.	18
1.1.4 Actividad solar, campo geomagnético y su relación con los sistemas biológicos.	20
1.1.5 Investigaciones de laboratorio sobre los efectos biológicos de los CEM.....	21
1.2 Las células cromafines.	27
1.2.1 Biosíntesis de las catecolaminas.	28
1.2.2 Regulación de la síntesis y liberación de catecolaminas.	29
1.2.3 Control de los niveles plasmáticos de catecolaminas.	30
1.2.4 Las células cromafines como modelo de estudio.	30
1.2.5 Células Cromafines y CEM.....	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
3. HIPÓTESIS.....	36
4. OBJETIVO.	37
4.1 Objetivos particulares.	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Cultivos de células cromafines.....	38
5.2 Exposición de las células cromafines al campo magnético.	38
5.2.1 Exposición de células cromafines a campos magnéticos con el dispositivo prototipo.	38
5.2.2 Exposición de células cromafines a CM con el dispositivo mejorado.	41
5.3 Inmunocitoquímica.	42
5.4 Cuantificación de la neurogenización.	43
5.5 Análisis de catecolaminas.....	43
5.6 Análisis estadístico.....	44
5. RESULTADOS.	45
5.1 Inmunocitoquímica de las células cromafines en cultivo.	45
5.2 Distribución de las células cromafines en los platos de cultivo.....	45
5.3 Análisis de catecolaminas.....	48
5.4 Neurogenización de células cromafines con el dispositivo prototipo.	50

<i>5.5 Neurogenización de células cromafines con el dispositivo mejorado.</i>	50
6. ANALISIS Y DISCUSION DE DATOS.	52
<i>6.1 Análisis de catecolaminas.</i>	52
<i>6.2 Morfología y distribución de las células cromafines en cultivo.</i>	52
<i>6.3 Neurogenización de células cromafines. Respuesta de tipo ventanas.</i>	53
<i>6.4 Teoría sobre el mecanismo de acción de los campos magnéticos.</i>	55
<i>6.5 Conclusiones.</i>	55
<i>6.6 Perspectivas</i>	55
7. BIBLIOGRAFIA	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Campos Magnéticos.

1.1.1 Antecedentes históricos.

Diversas leyendas envuelven los orígenes del descubrimiento del magnetismo. De acuerdo con una de ellas, el pastor Magnes (de allí magnetismo) se quedó pegado a la tierra, ya que los clavos de sus zapatos fueron atraídos por la magnetita.

El primer tratado europeo importante sobre el magnetismo se debe a Pedro Peregrino de Maricourt. En 1269, Peregrino distingue claramente los polos de un imán permanente; observa que el norte y el sur se atraen y que polos iguales, norte por ejemplo, se repelen; describe cómo, si se fragmenta un imán, se crean otros polos y discute sobre la aguja pivotada. Asevera además que son los polos magnéticos de la Tierra, los lugares a partir de los cuales los polos del imán reciben su virtud.

En el año de 1600 William Gilbert, quien fue el verdadero fundador de la ciencia del magnetismo, publicó su tratado *De Magnete*. En él, Gilbert describe múltiples fenómenos, tales como el que la atracción de la magnetita es concentrada en los extremos y que la Tierra se comporta como si tuviera un imán enterrado en ella. Además, describió la forma de fabricar imanes y dedujo las propiedades de atracción de los polos opuestos. Hacia 1750 John Michell pudo constatar que "la atracción o repulsión de los imanes decrece cuando los cuadrados de la distancia entre los respectivos polos aumenta". Pero no fue sino hasta el siglo XIX que se comenzó a vislumbrar la verdadera naturaleza del magnetismo, y uno de los primeros pasos fue el descubrimiento de su relación con la electricidad. Así, en el año de 1819 el físico danés Hans Christian Oersted, encontró que una corriente eléctrica sí tenía efectos sobre un imán. La experiencia de Oersted fue la siguiente: colocó un alambre por el que circulaba corriente eléctrica encima de una brújula y observó que la aguja se desviaba hacia el oeste. En seguida colocó este alambre debajo de la brújula y vio que la aguja también se desviaba, pero ahora, hacia el este. Oersted concluyó que para que la aguja imantada de la brújula se pudiera mover tenía que experimentar una fuerza magnética, y que la corriente eléctrica del alambre tuvo que generarla. Por lo tanto, una corriente eléctrica produce un efecto magnético. Ahora bien, este efecto magnético de la corriente eléctrica no puede quedar confinado dentro del alambre conductor, sino que tiene que estar esparcido en todo el espacio a su alrededor, para que alcance, por así

decirlo, hasta donde está la aguja. Esta fue la primera vez que alguien mencionó la idea de que el efecto magnético debe estar disperso en todo el espacio.

Dichos experimentos fueron reproducidos por Arago ante la academia francesa. Una persona que estuvo presente en esa sesión fue André-Marie Ampère (1775-1836), amigo de Arago. Ampère empezó a investigar el efecto en su casa. Primero, se dio cuenta de que Oersted no había entendido correctamente el fenómeno, ya que no había tomado en cuenta el efecto del magnetismo terrestre. Ampère diseñó entonces un experimento en el que éste fuera neutralizado. Así encontró el verdadero efecto que tenía la corriente eléctrica sobre la aguja imantada: ésta siempre se alinea en una dirección perpendicular a la dirección de la corriente eléctrica. Una semana después de haber presenciado la demostración de Arago, el 18 de septiembre, Ampère presentó a la Academia la primera de una serie de memorias de gran importancia: hizo sus presentaciones semanalmente hasta el 2 de noviembre y en cada ocasión anunció nuevos resultados. Además de la corrección a los experimentos de Oersted, informó lo siguiente el 18 de septiembre: *“Arreglé dos partes rectas de dos alambres conductores que están unidos en sus extremos con dos pilas voltaicas, en direcciones paralelas. Un alambre estaba fijo y el otro suspendido sobre puntos, de manera que pudiera moverse hacia el alambre fijo o separarse de él, pero siempre paralelo a él. Observé entonces que cuando hacía pasar una corriente de electricidad en ambos alambres simultáneamente, se atraían cuando las corrientes tenían el mismo sentido y se repelían cuando tenían sentidos opuestos”* (Tagüeña y Martina, 1998) (Figura 1.1).

Ampère determinó también que estas fuerzas entre los alambres que conducían corriente eléctrica se debían a efectos magnéticos: un alambre que conduce electricidad crea un efecto magnético a su alrededor (un campo), y el otro alambre, que también conduce corriente eléctrica, experimenta una fuerza. Es decir, propuso que el magnetismo que produce la corriente eléctrica en uno de los alambres genera a su vez una fuerza sobre el otro alambre que conduce electricidad. Pudo verificar que estas fuerzas no se debían a las cargas eléctricas que circulaban por cada uno de los alambres.

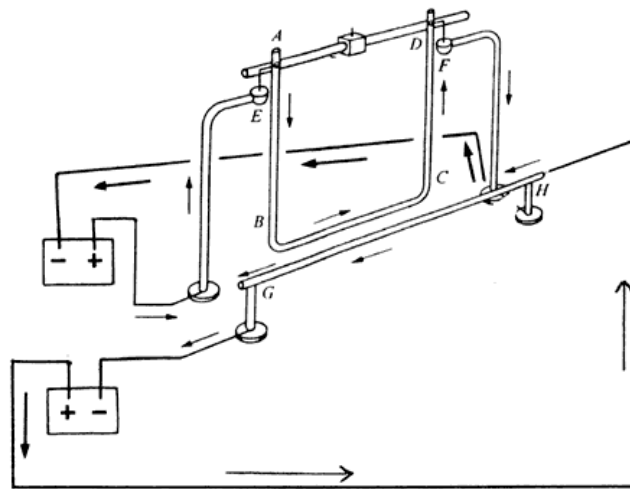


Figura 1.1. Esquema que ilustra el experimento con el que Ampère descubrió que dos alambres (el *GH* y el *BC*) que conducen electricidad ejercen fuerza entre sí.

A partir de sus experimentos Ampère encontró que las fuerzas entre los alambres dependen de la magnitud de las corrientes que circulan por ellos. A mayor corriente en cada alambre, mayor será la magnitud de la fuerza.

Posteriormente, Ampère descubrió que aun si los alambres no eran paralelos también había fuerzas entre ellos si ambos conducían corriente eléctrica, y que las características de estas fuerzas dependían de la colocación geométrica en que se encontraran. Ampère encontró cómo calcular la fuerza electromagnética entre dos conductores de electricidad que tuvieran posiciones y formas arbitrarias. Esto se ha llamado la ley de Ampère y es una de las leyes fundamentales del electromagnetismo.

En 1831 Michael Faraday descubrió la inducción electromagnética; ésta consiste en generar una corriente eléctrica moviendo un imán a través de una bobina. El fenómeno de la inducción electromagnética se puede resumir en un enunciado conocido como la ley de Faraday: "Se induce un campo eléctrico en toda región del espacio en la que exista un campo magnético que varíe con el tiempo. La magnitud del campo eléctrico inducido es proporcional a la rapidez con la que cambia el campo magnético. La dirección del campo eléctrico inducido es perpendicular al campo magnético variable". Faraday estableció claramente que las sustancias magnéticas interactúan unas con otras mediante las líneas de fuerza, hoy llamadas líneas de campo (Figura 1.2).

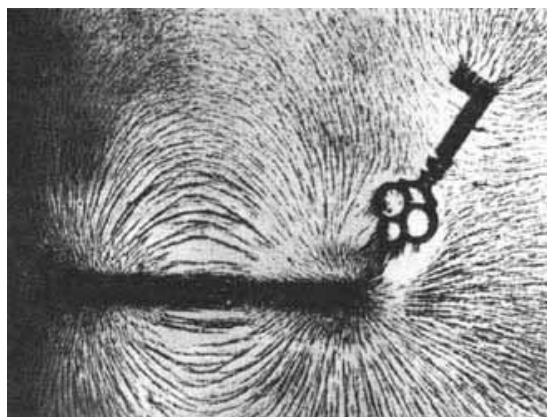


Figura 1.2. Fotografía de limadura de hierro espolvoreado sobre un papel, el cual se encuentra sobre un imán. En ésta se pueden observar las líneas de campo producidas por el imán.

El genio culminante de la física del siglo XIX , James Clerk Maxwell (1831-1879), tradujo estas ideas a un lenguaje matemático preciso, y en su monumental tratado aparecido en 1873 publicó las ideas de Faraday, sus propias ecuaciones y todo lo hasta entonces conocido en la materia. Maxwell derivó cuatro ecuaciones que resumen todas las investigaciones hechas por sus predecesores y que han servido como base a todo el desarrollo tecnológico en este campo. Las soluciones de las ecuaciones de Maxwell mostraron que una onda electromagnética se propaga a la velocidad de la luz. Heinrich Hertz, en 1888, mostró que estas ondas eran precisamente ondas de luz, lo que significó un paso gigantesco al mundo moderno (Tagüña y Martina, 1998).

1.1.2 Propiedades de los campos electromagnéticos.

Las ecuaciones de Maxwell unifican la teoría electromagnética. En la figura 1.3 se presenta su forma diferencial, que aparece en notación vectorial. Como se ve, en ellas aparecen dos cantidades físicas, \mathbf{E} y \mathbf{B} , que son el campo eléctrico y el magnético respectivamente. Esto nos indica que las ecuaciones de Maxwell se ocupan de cómo los campos están relacionados entre sí y nos lleva a caer en la cuenta de que el concepto de campo es esencial para interpretar y describir cualquier fenómeno electromagnético. Faraday introdujo el campo eléctrico. Supongamos que se tiene un arreglo de cargas fijas en el espacio y que estamos interesados en el efecto que éstas tienen sobre otra carga q que se lleva a su vecindad. La distribución de carga ejerce una fuerza sobre q proporcional a la misma carga q . El campo eléctrico \mathbf{E} asociado a esta distribución de cargas es esta misma fuerza dividida entre q .

$\text{Div } \mathbf{E} = 4 \pi \rho$ $\text{Div } \mathbf{B} = 0$ $\text{Rot } \mathbf{E} = - \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$ $\text{Rot } \mathbf{B} = \frac{1}{c} \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} + \frac{4\pi}{c} \mathbf{J}$	<p>\mathbf{E} = campo eléctrico</p> <p>\mathbf{B} = campo magnético</p> <p>c = velocidad de la luz</p> <p>\mathbf{J} = densidad de corriente</p> <p>ρ = densidad de carga eléctrica</p> <p>t = tiempo</p>
--	--

Figura 1.3. Ecuaciones de Maxwell en el vacío.

Esto se hace para obtener una cantidad que solamente depende de la distribución de cargas original. Ahora bien, para aclarar más esta definición del campo recordemos que en el siglo XIX el efecto de una carga sobre otra parecía ocurrir instantáneamente; de allí se derivó el concepto de "acción a distancia", esto es, que al tener una configuración de cargas y al mover, digamos, una de ellas, resulta que las otras parecen sentir su acción de inmediato, sin importar a qué distancia se encuentre la carga. A Faraday se le ocurrió visualizar el campo en términos de líneas de campo. Éstas líneas de campo son curvas cuya tangente, en cualquier punto, tiene la misma dirección que la fuerza entre las cargas. Estas curvas son continuas, excepto donde hay cargas o el campo es cero. Mientras

más densas sean estas líneas de campo, más fuerte es el mismo. Nótese que el campo eléctrico (y el magnético) poseen magnitud y dirección, o sea que para definirlos necesitamos de estos dos datos. En lenguaje matemático, los campos son vectores.

Ahora bien, ¿cómo definimos el campo magnético? de la misma manera en que definimos el campo eléctrico como la fuerza que se ejerce sobre una carga unitaria en reposo, podemos definir otro campo, el magnético, como la parte de la fuerza que involucra la velocidad de la carga y actúa sobre una carga en movimiento. Por lo tanto, la fuerza que actúa sobre una carga tiene una parte estática que sirve para definir el campo eléctrico y una parte dinámica que lo hace para el campo magnético. Esta es la conocida fuerza de Lorentz, llamada así en honor del físico holandés con este nombre. Con el campo definido de esta manera se puede predecir la parte dependiente de la velocidad para la fuerza que actúa sobre cualquier partícula cargada moviéndose a una velocidad dada. El concepto de campo es muy poderoso, pues conociendo el campo eléctrico y el magnético en un punto podemos predecir el movimiento de cualquier carga en este punto.

El describir los fenómenos electromagnéticos en términos de campos permite que el concepto de energía pueda ser introducido en forma natural. Los campos son portadores de energía. De hecho, es frecuente mencionar que tanto el campo eléctrico como el magnético almacenan energía. Dada una distribución de cargas o corrientes eléctricas, se tiene una energía potencial asociada a la misma. Más específicamente, dado un campo, la energía potencial asociada al mismo se representa como el cuadrado del campo en cuestión. Al describir la propagación de ondas electromagnéticas veremos que es natural asociar la energía que transportan las ondas con la energía de los campos.

LEYES DE MAXWELL.

Las leyes de Maxwell resumen y encuadran dentro de una teoría los conocimientos que sobre el comportamiento de los campos, cargas y corrientes en el vacío y en la materia se habían venido acumulando durante muchos años de investigación. A continuación se describirán las leyes fundamentales del electromagnetismo y su relación con los fenómenos fundamentales en la materia. Cuatro son las leyes de Maxwell. Éstas, de hecho, fueron descubiertas por científicos anteriores a este

gran físico. Sin embargo, éste supo reformularlas, completarlas y obtener de ellas un torrente de información sobre los fenómenos electromagnéticos. Estas leyes son:

- 1) Ley de Gauss, que se ocupa del campo y de las cargas eléctricas y es equivalente a la ley de Coulomb;
- 2) Ley sobre la ausencia de cargas magnéticas libres;
- 3) Ley de Faraday, sobre la inducción electromagnética, y
- 4) Ley de Ampère-Maxwell sobre la dependencia del campo magnético de la corriente eléctrica y la variación del campo eléctrico.

Hay que enfatizar que estas leyes fueron descubiertas experimentalmente; con excepción de una parte de la ley de Ampère-Maxwell (la parte de Maxwell). Se puede afirmar que fue Faraday quien, al descubrir la ley que lleva su nombre, introdujo el campo magnético en 1845. Junto con estas leyes existen las llamadas relaciones constitutivas, que relacionan los campos con la magnetización y polarización de la materia. Estas relaciones y la fuerza de Lorentz, descrita anteriormente, completa el gran edificio del electromagnetismo clásico (Tagüeña y Martina, 1998).

LEY DE GAUSS.

La ley de Gauss es equivalente a la ley de Coulomb, la cual asevera que la fuerza entre dos cargas es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa. Dicha fuerza puede ser repulsiva o atractiva, según que las cargas sean de signo igual o contrario respectivamente. Esta ley ha sido comprobada empíricamente en innumerables ocasiones. Como vimos más atrás, el campo eléctrico está relacionado con la fuerza entre una carga de prueba y otra carga, ya que si dividimos esta fuerza entre la carga de prueba obtenemos el campo eléctrico producido por la otra carga. Es notable que la fuerza con la cual interactúan dos cargas no cambia por la presencia de una tercera.

Así pues, el campo eléctrico es producido siempre por una fuente, la cual puede ser una carga o un sistema de cargas. La relación entre el campo eléctrico y sus fuentes puede ser expresada en forma sencilla definiendo el concepto de flujo. En la figura 1.4 se representa una superficie cerrada de forma arbitraria. El campo representado por las líneas atraviesa esta superficie. Si la dividimos en pequeñas secciones de tal forma que cada pedazo de superficie sea plano y el campo eléctrico no cambie apreciablemente de una sección a la contigua, podemos definir el flujo como el producto del

campo eléctrico por el área de la sección que atraviesa. O sea que el flujo nos da una idea de la cantidad de campo que atraviesa una superficie si usamos todas las secciones que componen esta superficie.

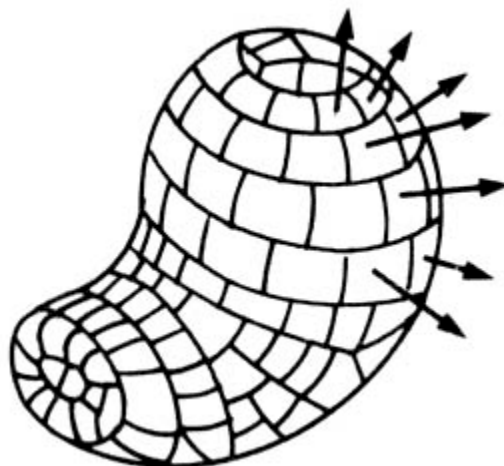


Figura 1.4 Esquema que muestra una superficie cerrada sobre un campo que se divide en pequeños elementos de área. Cada elemento se representa por un vector.

Hasta ahora hemos considerado que la superficie no encierra ninguna carga. Pero ¿qué ocurre si lo hace? Es la ley de Gauss la que nos da la respuesta: el flujo de campo eléctrico a través de cualquier superficie cerrada es proporcional a la carga total encerrada por esa superficie. Esta es una ley que tiene el mismo contenido físico que la ley de Coulomb, pero expresado en términos del campo y no de la fuerza. Asimismo permite la obtención de expresiones para el campo electrostático dado cualquier arreglo de cargas en reposo. De hecho, el campo eléctrico decrece de la misma forma que el cuadrado de la distancia al alejarse de una carga puntual.

Muchas veces, sin embargo, el dato que se utiliza para obtener información acerca del campo eléctrico es la diferencia de potencial que aparecerá también al examinar la ley de inducción. El potencial eléctrico es una cantidad escalar, pues sólo se describe con una magnitud, y sirve para medir la cantidad de trabajo por unidad de carga que se realiza al mover una carga positiva de un punto a a un punto b en el campo eléctrico (Figura 1.5).

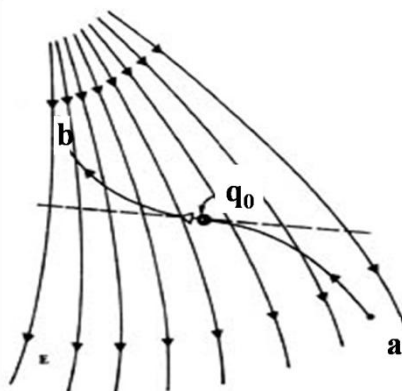


Figura 1.5 Esquema que muestra una carga de prueba q_0 se mueve de a a b en un campo eléctrico por medio de la acción de una fuerza externa.

La diferencia de potencial entre los dos puntos es independiente de la trayectoria que se tome para ir de a a b y su variación nos proporciona el campo eléctrico. Para hacer contacto con las manifestaciones cotidianas de la electricidad, diremos que la diferencia de potencial no es otra cosa que el voltaje, al cual nos referimos continuamente. El que haya poco voltaje significa que hay poca diferencia de potencial y que por lo tanto las cargas eléctricas, en este caso electrones, fluyen en forma más errática y que en consecuencia tenemos menos corriente.

LEY SOBRE LA AUSENCIA DE CARGAS MAGNÉTICAS LIBRES.

Experimentalmente se llegó al resultado de que los campos magnéticos, a diferencia de los eléctricos, no comienzan y terminan en cargas diferentes. Esta ley primordialmente indica que las líneas de los campos magnéticos deben ser cerradas. En otras palabras, se dice que sobre una superficie cerrada, sea cual sea ésta, no seremos capaces de encerrar una fuente de campo, esto expresa la inexistencia del monopolo magnético.

LEY DE INDUCCIÓN DE FARADAY

Entre los físicos que empezaron a investigar la relación entre electricidad y magnetismo, Faraday fue el que realizó las contribuciones más importantes, junto con Ampère. Aquél, entre otras cosas, encontró que una aguja se magnetiza por el pulso de corriente inducida y que puede ser magnetizada en sentido opuesto cuando el circuito primario es desconectado. Esto es consecuencia de la fuerza

que un campo magnético ejerce sobre una carga en movimiento. Si imaginamos un circuito moviéndose en un campo magnético producido por una corriente uniforme y suponemos que una carga se mueve en el circuito, podemos definir a la fuerza electromotriz como la cantidad proporcional al trabajo que se hace para mover la carga en cuestión a lo largo del circuito. Si la resistencia del circuito es R , la fuerza electromotriz E hará circular una corriente I en el circuito de acuerdo con la ley de Ohm $I=E/R$. Esto indica que la fuerza electromotriz está íntimamente relacionada con la diferencia de potencial definida en párrafos anteriores. Así, la fuerza electromotriz es proporcional a la variación temporal del flujo de campo magnético que ocurre al desplazarse el circuito (Figura 1.6). Puede ocurrir que el circuito se agrande, cambie de forma, etc., dando lugar a que cambie el flujo y por lo tanto se origine una fuerza electromotriz. ¿Qué dirección sigue la corriente en el circuito? Lenz aplicó el principio, basado en la ley de conservación de la energía, de que un sistema físico tiende a oponerse a cambiar del estado en que se encuentra. De esta manera, si sucede que el flujo que pasa por un circuito aumenta con el tiempo, aparecerá un nuevo flujo en dirección opuesta producido por una corriente en el circuito. Como la dirección de la corriente y del campo magnético están relacionadas, se puede obtener la dirección de la corriente conociendo la dirección del flujo.

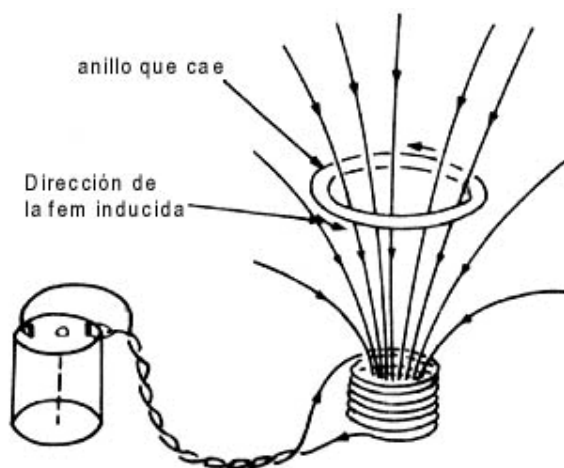


Figura 1.6 A medida que el anillo cae, el flujo a través del anillo crece. Según la ley de Lenz, la fuerza electromotriz inducida (fem) seguirá la dirección de las flechas.

En resumen, al mover un circuito en un campo magnético, la fuerza electromotriz inducida genera una nueva corriente eléctrica en el circuito, que es proporcional al flujo del campo magnético. Faraday demostró que lo mismo ocurre cuando se varía la corriente y el circuito se mantiene en reposo, en lugar de mantener constante la corriente que genera el campo magnético en donde se mueve el circuito. Estas dos situaciones son equivalentes y a partir de ellas podemos enunciar la ley de inducción, en forma general, como sigue: la fuerza electromotriz inducida en un circuito es proporcional a la variación temporal del flujo del campo magnético que rodea al circuito.

Como la fuerza electromotriz se relaciona con el campo eléctrico, la ley establece una relación entre el campo eléctrico en una trayectoria cerrada y la razón de cambio temporal del campo magnético. Esta ley es una relación fundamental que nos muestra cómo se induce un campo eléctrico al variar el campo magnético.

LEY DE AMPÈRE-MAXWELL.

El hecho experimental con el que se relaciona esta ley es la producción de campos magnéticos cuando circula una corriente eléctrica. Ampère descubrió más tarde que si una corriente eléctrica estacionaria circula por un alambre y trazamos una trayectoria cerrada alrededor del alambre, entonces el producto del campo magnético originado por la corriente, por la longitud de esta trayectoria, es proporcional a la corriente. El resultado llevó a Ampère a proponer que el magnetismo en la materia es causado por corrientes de electrones en sus órbitas.

Por cierto tiempo se creyó que sólo la corriente eléctrica generaba un campo magnético. Sin embargo, faltaba un elemento que el genio de Maxwell aportó. Su razonamiento fue el siguiente. Como la carga eléctrica está compuesta de cargas en movimiento y la carga no se crea ni se destruye, la llamada ecuación de continuidad establece que si la carga varía con el tiempo en un punto del espacio, existe una fuente o sumidero de corriente en ese punto. Recordemos que la ley de Ampère es válida para corrientes estacionarias que no varían con el tiempo. Supongamos ahora que tenemos una distribución de cargas que varían con el tiempo. Se debe entonces agregar un término a la ley de Ampère. Este término proviene del hecho de que al variar un campo eléctrico se origina un campo magnético. En ausencia de corriente eléctrica éste deberá ser el único efecto que generara un campo

magnético. Notemos que el caso es análogo a lo que sucede en la ley de Faraday y que al agregar este término Maxwell hizo simétricas las ecuaciones (Figura 1.3). ¿Por qué Faraday no notó este efecto en sus experimentos? Esto se debe a que en cualquier aparato en el cual varía el campo eléctrico, éste lo hace en forma muy lenta. Para hallar el efecto se necesita que el campo cambie rápidamente, tan rápidamente como el tiempo que la luz tarda en cruzar el aparato, o sea tiempos pequeñísimos. Usando microondas, Hertz comprobó la existencia de este efecto predicho por Maxwell. Por lo tanto, se puede enunciar la ley como sigue: la relación de variación temporal del campo eléctrico más la corriente estacionaria producida por cargas en movimiento es proporcional al campo magnético a lo largo de una trayectoria cerrada.

CAMPO MAGNÉTICO Y MATERIA.

Es conveniente clasificar a las sustancias de acuerdo a su comportamiento para poder aplicar las leyes estudiadas en las secciones anteriores, debidamente modificadas, para tomar en cuenta que hay materia. Así, las sustancias que son repelidas por los imanes son llamadas diamagnéticas, por ejemplo el agua y los compuestos orgánicos. Las sustancias atraídas hacia campos más fuertes son llamadas paramagnéticas. En algunos metales el paramagnetismo es débil y en otros fuerte. Además, a bajas temperaturas el paramagnetismo aumenta, tal como sucede con el oxígeno líquido. Finalmente, las sustancias que se comportan como el hierro y la magnetita son llamadas ferromagnéticas.

Para caracterizar macroscópicamente las diversas sustancias es conveniente introducir el concepto de momento magnético. Este se define como la cantidad proporcional al producto de la corriente que se mueve en un circuito por el área encerrada por el mismo. Si aplicamos un campo magnético externo, veremos que la fuerza sobre este dipolo es proporcional al campo magnético aplicado, y el resultado experimental es que las sustancias paramagnéticas y diamagnéticas adquieren un momento magnético proporcional al campo. Esta relación es lineal y podemos definir a la susceptibilidad magnética \mathbf{X} como la relación entre el momento magnético y el campo. Para sustancias diamagnéticas la susceptibilidad es pequeña, del orden de -1×10^6 . Para materiales paramagnéticos \mathbf{X} es positiva y mayor. Sin embargo, en otro sistema el campo producido por los momentos magnéticos es grande, por lo que deberíamos tomar en cuenta estos campos y adicionarlos al campo aplicado. Aquí es conveniente hacer notar que las corrientes pueden clasificarse como corrientes libres y ligadas. Las corrientes libres están asociadas a un nuevo campo

magnético \mathbf{H} , distinto de nuestro conocido campo magnético \mathbf{B} , mientras que este último está asociado a la corriente total. De paso mencionaremos que nuestro conocido campo eléctrico \mathbf{E} está asociado a la carga total. La diferencia entre \mathbf{H} , llamado desplazamiento magnético, y el campo \mathbf{B} , es proporcional a la magnetización del material, y su razón es la llamada permeabilidad magnética. Sin embargo, el campo magnético fundamental es \mathbf{B} , ya que no existen cargas magnéticas libres (Tagüeña y Martina, 1998). Habiendo examinado la susceptibilidad magnética para sustancias diamagnéticas y paramagnéticas, pasemos a estudiarla cuando el material es ferromagnético. Ya se habrá notado que el ferromagnetismo es el fenómeno que atrajo la atención del hombre hacia la magnetita, puesto que es magnetismo "permanente". La fuerza sobre una sustancia paramagnética es proporcional a la variación del campo, lo que sugiere que, si el campo es muy fuerte, el momento magnético de un ferromagneto alcanza un límite. Aun sin campo externo los ferromagnetos conservan su magnetización, pero la pierden al elevarse la temperatura. Además, su magnetización es mucho mayor que la de los materiales paramagnéticos. Todo esto sugiere que los dipolos magnéticos deben estar "amarrados" en una dirección por "algo" de naturaleza distinta a los mecanismos discutidos hasta ahora. Por ejemplo, el hecho de que a determinada temperatura se destruya el ferromagnetismo indica que los momentos magnéticos no están alineados. Por supuesto que los materiales están compuestos de los llamados dominios magnéticos, en donde millones de momentos están alineados en una dirección (Figura 1.7). Si hay más dominios con un momento magnético promedio en una dirección determinada, el material estará magnetizado.

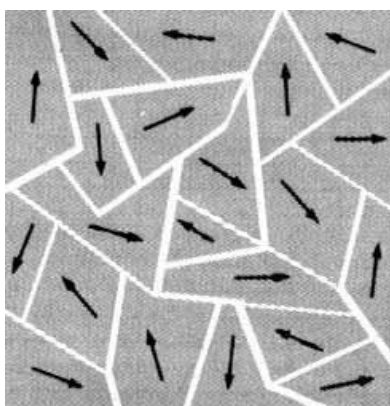


Figura 1.7 Se muestran los dominios magnéticos en un material ferromagnético orientados al azar. Sin embargo, en cada uno de ellos todos los dipolos magnéticos se alinean en una dirección dada por las flechas.

¿Cuál es la relación entre la magnetización y el campo en un ferromagneto? Supongamos que tomamos hierro desmagnetizado y aplicamos un campo magnético externo, el cual hace variar \mathbf{B} que está relacionado con la corriente total. En la figura 1.8 podemos ver que al incrementar el campo magnético externo los dominios se alinean fácilmente, pero que después se necesita un campo mayor para conseguir una pequeña variación de las corrientes ligadas. Si ahora disminuimos el campo externo, veremos que la curva no retorna al punto de partida por el camino que seguía al aumentar el campo. Éste es el fenómeno de histéresis que se debe a la irreversibilidad del proceso y que es indispensable para obtener una magnetización permanente.

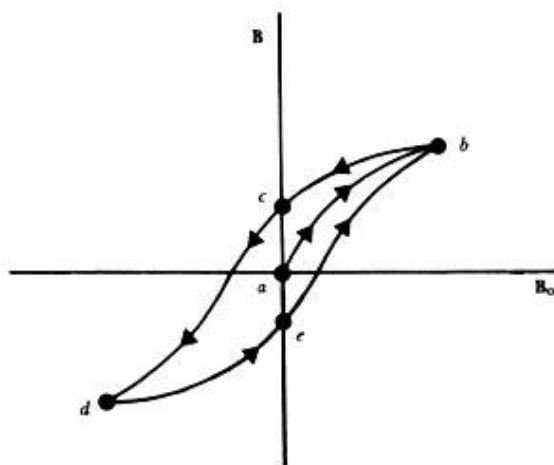


Figura 1.8 Curva de magnetización (ab) y su curva asociada de histéresis ($ebcde$) para una muestra de hierro.

MAGNETISMO TERRESTRE

Fue Gauss el primero en describir el campo magnético terrestre. Publicó la obra *Intensitas vis magnetical terrestris ad mensuram absolutam revocata* en 1832. Como resultado de sus estudios concluyó que más del 97% de la fuerza magnética que se observa en la superficie de la Tierra se origina en su interior. Un campo magnético puede ser producido por un imán permanente o por corrientes eléctricas, y alguna de esas dos causas debe ser la responsable. El núcleo de la Tierra parece estar compuesto principalmente de hierro y níquel, que son materiales ferromagnéticos a temperaturas ordinarias. Sin embargo, la temperatura del núcleo terrestre es sin duda superior a la crítica, arriba de la cual los ferromagnetos dejan de presentar un orden magnético. No puede suponerse, por lo tanto, que

dentro de la Tierra hay un imán permanente. La explicación del magnetismo terrestre tendría que estar relacionada, por tanto, con las corrientes eléctricas que se generan en su núcleo.

A partir del año de 1850, se han medido en forma sistemática, tanto la magnitud como la dirección del campo magnético terrestre. En la actualidad se usan aviones especiales para este propósito, además de satélites artificiales. Con base en los análisis de estos resultados se ha demostrado que el campo observado puede presentarse en forma aproximada como el producido por un imán hipotético cuyo eje se inclina ligeramente con respecto al eje de rotación. Sin embargo, la intensidad, ubicación y dirección de este imán hipotético han cambiado apreciablemente. Los datos han llevado a la conclusión de que el campo magnético terrestre es sumamente variable. Existe una indicación para estimar la intensidad del campo magnético terrestre que fue descubierta ya hace algunos años. En 1853, Melloni, en Italia, descubrió que las rocas volcánicas tienen una magnetización permanente bastante fuerte. Supuso que este magnetismo se debía a la acción que sobre ellas tuvo el campo magnético terrestre en el momento en que se enfriaban. Esta suposición fue posteriormente comprobada: la fuerte magnetización remanente de las rocas volcánicas recientes puede ser reproducida exactamente mediante el enfriamiento desde una temperatura alta, en presencia del campo magnético de la Tierra, resultando que la intensidad de la magnetización remanente adquirida es proporcional a la intensidad del campo magnético aplicado.

Las rocas ígneas se componen principalmente de magnetita con algo de óxido de titanio. Las partículas magnéticas en las rocas pueden ser magnetizadas fácilmente aun en presencia de un campo relativamente débil. Con un descenso en la temperatura se incrementa la intensidad de esta magnetización adquirida y a temperatura ordinaria se produce una magnetización estable y fuerte. En la figura 1.9 se muestra un resumen de las medidas de la intensidad del campo magnético de los últimos 9 000 años, a partir de estudios en ladrillos, cerámicas y lavas volcánicas. Comparado con datos actuales, se puede concluir que el campo magnético ha fluctuado, desde hace 9,000 años, alrededor de valores semejantes a los de hoy.

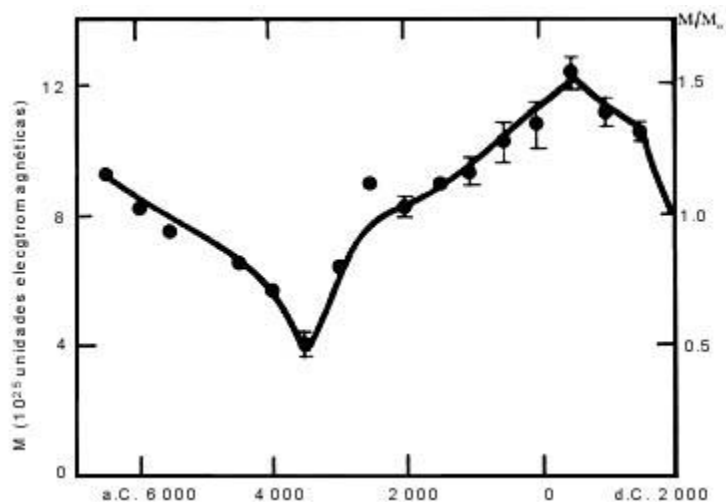


Figura 1.9 Movimiento del momento magnético de la Tierra (M) expresado en términos de su valor diario (M_0) a lo largo de los últimos nueve mil años.

Al estudio de la intensidad y la dirección del campo magnético de la Tierra en el pasado, por medio de rocas naturales, para determinar así sus cambios durante largos periodos de tiempo, se le conoce como paleomagnetismo. El desarrollo del paleomagnetismo llevó a un resultado sorprendente: el campo magnético ha sufrido diferentes inversiones en el pasado. Claramente la antigüedad de la lava aumenta con la profundidad. La dirección de la magnetización remanente de dos capas superiores (3.62 y 3.68 millones de años), así como de una muy profunda (4.5 millones de años) es prácticamente paralela a la del campo magnético terrestre actual. Sin embargo, la magnetización remanente de todas las capas intermedias está orientada en forma antiparalela a la actual. Se piensa que una inversión completa del campo magnético de la Tierra toma de 1 000 a 10 000 años. Una importante utilidad del campo magnético terrestre es que nos protege del viento solar. El viento solar es un plasma, gas de hidrógeno ionizado, que emana del Sol, habiendo sido parte de la corona solar. La velocidad del flujo del plasma es de 300 a 400 km/seg en condiciones normales y puede llegar a 800 km/seg en una tormenta.

En la figura 1.10 se muestra un ejemplo de una simulación de la interacción entre el viento solar y el campo magnético. Cuando el modelo de la Tierra no tiene campo, el plasma hace impacto directo con la superficie. En cambio, cuando se le conecta un fuerte imán, el plasma se desvía y se

forma una cavidad alrededor del modelo de la Tierra. La enorme cavidad natural en torno a la Tierra es conocida actualmente como la magnetósfera y su larga cola debida al viento solar en dirección opuesta al Sol es llamada cola geomagnética. Las partículas cargadas, principalmente electrones y protones, quedan atrapadas en diferentes "cinturones" de energía llamados cinturones Van Allen. Sus órbitas están confinadas en un plano ecuatorial alrededor de la Tierra debido al campo magnético. Hay dos cinturones de electrones, aproximadamente a 2 000-5 000 y 13 000-19 000 kilómetros sobre la superficie de la Tierra, y los protones parecen estar distribuidos en capas intermedias. Las partículas en las capas externas provienen principalmente del viento solar, pero dos de las capas internas están formadas por rayos cósmicos. Así pues, el campo magnético terrestre constituye una defensa para la Tierra de las partículas cargadas que permanecen en órbitas que oscilan de norte a sur del ecuador magnético en los cinturones Van Allen.

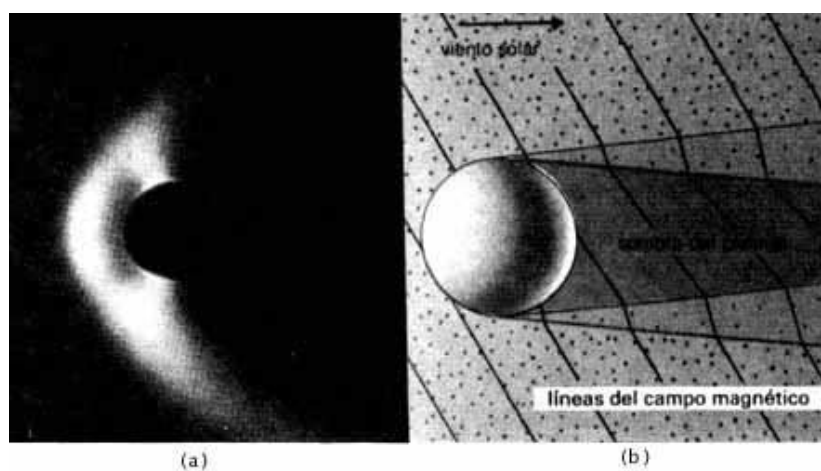


Figura 1.10 Relaciones entre el viento solar y el campo magnético de la tierra.

- a) La relación entre el viento solar y el campo magnético se puede simular en el laboratorio haciendo incidir un flujo de plasma de electrones y de iones de helio sobre una esfera que contiene un electromagneto. El chorro de plasma es desviado en forma análoga a como sucede en la tierra cuando llega el viento solar.
- b) Diagrama construido con base en los datos recopilados por satélites artificiales ilustrando la relación real entre el viento solar y el campo magnético de la Tierra. Los puntos en la figura representan el flujo de partículas que llega del Sol. Las líneas de fuerza del campo magnético están aplastadas del lado opuesto. A este fenómeno se le llama magnetósfera.

1.1.3 Campos electromagnéticos y sistemas biológicos.

Hacia la última parte del siglo XVIII un gran número de personas empleó animales para estudiar las descargas eléctricas y utilizó como fuentes máquinas generadoras y botellas de Leiden. Una de estas personas fue Luigi Galvani (1737-1798), profesor de anatomía en la Universidad de Bolonia, Italia. Sus discípulos se dieron cuenta de que cuando se sacaban chispas de un generador y se tocaban simultáneamente las patas de una rana con un bisturí, éstas se contraían. Galvani estudió con más detalle este curioso fenómeno. En primer lugar, unió una extremidad de la rana a un pararrayos y la otra la fijó a tierra por medio de un alambre metálico. Descubrió que los músculos se estremecían cuando había tormenta, pues las cargas que recogía el pararrayos se transportaban a través del músculo hasta la tierra. La conexión la realizó de la siguiente manera: en un extremo de la pata conectó un alambre de cobre, mientras que en el otro extremo conectó uno de hierro (Figura 1.11). En cierto momento, y de manera accidental, juntó los alambres y se dio cuenta de que la pata se contraía. De sus experiencias anteriores sabía que esta contracción ocurría solamente cuando una carga eléctrica pasaba por la pata, pero ¡no había conectado ningún extremo a ninguna fuente de carga eléctrica! Así llegó a la conclusión de que si se formaba un circuito cerrado entre dos metales que pasara por la pata, se generaba una corriente eléctrica que circulaba por el circuito. Sin embargo, Galvani no estaba en lo cierto, ya que creyó que la fuente de la electricidad estaba en lo que llamó "electricidad animal". Galvani se dedicó a hacer experimentos con diferentes animales creyendo que había descubierto y confirmado la veracidad de la electricidad animal. Con el tiempo se comprobó que sus hipótesis no eran correctas.

Alejandro Volta (1745-1827), profesor de la Universidad de Pavia, Italia, se enteró de los experimentos de Galvani y los repitió, usando lo que llamó ranas "galvanizadas". Sin embargo, no aceptó la explicación de Galvani. Volta se dio cuenta de que para lograr el efecto descubierto por Galvani se necesitaba cobre, hierro y el líquido del tejido muscular. Hizo una serie de experimentos muy cuidadosos, utilizando alambres de diferentes materiales; así descubrió que si usaba estaño y cobre lograba una corriente relativamente fuerte, mientras que si usaba hierro y plata el efecto era poco intenso. Siguiendo esta línea de pensamiento dejó de usar ranas y puso su propia lengua entre los metales, logrando el mismo efecto; en seguida probó con diferentes líquidos entre los metales y

siempre encontró el mismo efecto. El caso más satisfactorio fue cuando usó placas de zinc y cobre sumergidas en ácido. De esta manera llegó a la conclusión de que el efecto descubierto por Galvani no tenía nada que ver con la "electricidad animal" sino que se debía a una acción química entre el líquido, llamado electrolito, y los dos metales. Es así como Volta construyó lo que posteriormente se llamó una pila voltaica, que fue el primer dispositivo electroquímico que sirvió como fuente de electricidad.



Figura 1.11 Si los metales hierro y cobre se unen, el anca de la rana se contrae debido al paso de una corriente eléctrica.

Sin embargo, los primeros estudios rigurosamente científicos, sobre los efectos que los campos electromagnéticos (CEM) tienen sobre los seres vivos se remontan al año de 1881. En ese año el médico ruso Grigoríjev publica, en la ciudad de San Petersburgo, el libro "Metaloscopia y Metaloterapia" que es una recopilación de datos sobre la acción terapéutica de los campos magnéticos. En el año de 1901 se publica "Investigación en la acción fisiológica a distancia de la electricidad" por el fisiólogo V. Danilevsky. En esta obra se describe la reacción del sistema nervioso central a CEM y el autor define las siguientes cuestiones como un problema general: "... la influencia a distancia de un flujo magnético, de un campo eléctrico y electromagnético, la influencia de los rayos eléctricos en sus diferentes formas y combinaciones, incluyendo la acción de corrientes de alto voltaje y alta frecuencia. Los objetivos de la investigación no deben ser sólo preparaciones de nervios y músculos, sino también organismos enteros..."

1.1.4 Actividad solar, campo geomagnético y su relación con los sistemas biológicos.

El campo geomagnético (CGM) es un factor que actúa constantemente sobre la superficie de la Tierra. La magnitud y dirección del CGM es diferente en cada área de la Tierra. Puede variar de $\sim 35 \mu\text{T}$ en el área ecuatorial, donde es paralelo a la superficie de la Tierra, a $\sim 70 \mu\text{T}$ cercano a los polos magnéticos de la Tierra, donde es casi vertical. Las variaciones en el CGM son principalmente causadas por la influencia del Sol. El Sol emite radiación electromagnética, inherente a su actividad (viento solar), que al chocar con el campo magnético de la Tierra produce una alteración del mismo, a este evento se le conoce como tormenta magnética (TM). Las TM provocan perturbaciones agudas en el CGM que abarca la Tierra entera y pueden durar desde algunas horas hasta varios días.

Con el propósito de revelar el papel del campo geomagnético (CGM) en la vida de animales y plantas, se crearon cámaras especiales que aislaban del CGM desde un 10 hasta un 100 por ciento. Y aunque estos experimentos eran de difícil realización debido a la necesidad de generar todos los parámetros ambientales y ecológicos dentro de estas cámaras, arrojaron datos interesantes: depresión de funciones vitales de algunas bacterias; cambios en el ritmo de división de fibroblastos humanos; aumento en la tasa de aprendizaje en ratas; cambios en las estructuras subcelulares de algunas plantas; reducción de la proliferación, entre otros (Zhadin, 2001).

La influencia de la actividad solar (tormentas magnéticas) sobre el CGM, la biosfera y los procesos sociales llamaban ya la atención de los científicos desde el comienzo del siglo XX. Sin embargo esta idea fue desarrollada a profundidad en los trabajos de A. Chizhevsky (1928, 1931, 1973, citado por Zhadin, 2001) "como el primer gran problema interdisciplinario de la historia de la ciencia: Actividad solar-Biosfera-Sociedad". Chizhevsky formuló los siguientes puntos:

- La actividad solar influye a todos los seres vivos desde las bacterias hasta los seres humanos;
- Los ciclos de 11 años (ciclos donde la actividad solar es mayor) son importantes en muchos fenómenos del mundo orgánico, y depende del área geográfica;
- El factor físico que media la acción de la actividad solar con los seres vivos y la biosfera es principalmente el electromagnetismo.

Actualmente se sabe que tormentas magnéticas (TM) correlacionan con la ansiedad e irritabilidad en la gente, falta de concentración en su trabajo, lo cual aumenta la probabilidad de accidentes en el transporte y de errores en los planes de vuelo. Durante el curso de tormentas magnéticas las llamadas de emergencia aumentan, así como ataques cardiovasculares agudos, las muertes súbitas, de hospitalización por esquizofrenia, psicosis alcohólicas, ataques epilépticos e incluso los principales eventos en la historia europea como las guerras, ciclos económicos, crisis sociales y trabajos intelectuales y creativos están relacionados (Zhadin, 2001).

En animales estudiados en laboratorio durante TMs también se encontraron cambios. Durante una TM, ocurrida de septiembre 21 al 23 de 1984, se estudiaron seis parámetros fisiológicos del sistema cardiovascular y de la estructura de cardiomiocitos en conejos (Chibizov y cols., 1995). En cada parámetro cardiovascular medido la actividad cardíaca cayó, se observó una destrucción y degradación de mitocondrias en cardiocitos. También, fue registrada la actividad de neuronas en la neocorteza motora de gatos (Sidjakin y cols., 1989). La actividad fue inducida por estimulación eléctrica del núcleo caudado. Setenta por ciento de las neuronas respondieron con una excitación y el 30% con una inhibición. Durante los días de TM la actividad excitatoria fue reducida y la inhibición se extendió.

En los trabajos antes mencionados, los efectos biológicos se correlacionaban con la manifestación de perturbaciones del CGM, debido a las tormentas magnéticas. A partir de esto, diferentes laboratorios comenzaron a realizar experimentos donde se utilizaron campos electromagnéticos (CEM) de corriente directa (CD) y parámetros previamente asignados (amplitud, frecuencia y duración de la exposición). Esto permitió a los investigadores observar los efectos en animales y humanos con más detalle, y tener un acercamiento en el establecimiento de las relaciones causa-efecto, así como un entendimiento en los mecanismos de acción de los CEM.

1.1.5 Investigaciones de laboratorio sobre los efectos biológicos de los CEM.

El sistema nervioso fue considerado, desde el principio de las investigaciones, como el sistema más sensible de un organismo a la estimulación con CEM. Por lo tanto muchas investigaciones fueron dirigidas hacia este sistema. En 1971 Vjalov reportaba: fatiga, mareos, somnolencia, dolor de cabeza

y corazón, en trabajadores que se exponían sistemáticamente a algunos cientos de militeslas (mT). Por otro lado, una magnitud de 50 mT incrementaba la actividad motriz en ratones, mientras que una fuerza de 100-200 mT causaba una depresión de ésta actividad. Un CEM (100-200 mT) aplicado a la cabeza de un conejo inducía, en el electroencefalograma, la aparición de ondas lentas y espigas de alta amplitud. En los seres humanos efectos similares fueron observados: aparición de ondas lentas y espigas de ritmo alfa. Se demostró que en diferentes estructuras de cerebro de ratón (neocorteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo) la acción de un CM de 90 mT, provocaba una respuesta inicialmente inhibitoria. Desde el inicio de este tipo de investigaciones Aleksandrovskaia y Kholodov (1966) propusieron que era la glia el mediador entre los CM y las neuronas. Ellos observaron, por medio de microscopía electrónica, (después de la exposición a un CM de 20-30 mT, 1 h) un aumento en el número de astrocitos, microglia y oligodendrocitos en la neocorteza de conejo. Las neuronas por otro lado no presentaban cambios (Zhadin, 2001).

Desde 1940, en los EE.UU., la generación y consumo *per capita* de energía ha aumentado en un factor de 10 y 20 respectivamente. La exposición a campos magnéticos de extrema baja frecuencia (CEM-EBF) ha aumentado de 4 a 5 veces desde dicho año (Lacy-Hulbert y cols., 1998). CEM-EBF a los que regularmente estamos expuestos, han sido implicados como factores de contribución a la incidencia de cánceres infantiles como leucemias y cánceres cerebrales. Desde 1979 comenzaron los estudios epidemiológicos que buscaron la relación entre la exposición residencial de CEM-EBF y la incidencia de cánceres (véase Tabla 1). No obstante, a pesar de las controversias, la balanza se inclina por una no-relación entre la exposición a CEM-EBF y leucemia infantil. Cabe mencionar que en estudios en adultos la relación cáncer-CEM-EBF esta más relacionada a la exposición en el trabajo que en sus hogares. Aún así ninguno de los estudios publicados provee una evidencia clara a la cuestión de si las exposiciones a CEM-EBF influyen en el desarrollo de cáncer (Lacy-Hulbert y cols., 1998; Kheifets y Shimkada, 2005).

A partir de estos estudios epidemiológicos una amplia variedad de experimentos han sido usados para detectar efectos mutagénicos de los CEM-EBF, incluyendo ensayos para mutaciones puntuales, rupturas de DNA, translocaciones, formación de micronúcleos, entre otros (véase Tabla 2). También se ha estudiado la posibilidad de los CEM-EBF como generadores de radicales libres

(Tabla 3). Todos estos estudios disponibles no han arrojado una evidencia consistente de que los CEM-EBF afecten a los sistemas celulares por mecanismos que generen radicales libres, como tampoco hay evidencia firme de que generen daño al DNA (Lacy-Hulbert y cols., 1998).

En principio, los CEM-EBF pueden intervenir en los mecanismos de control de proliferación celular de una manera muy similar a los promotores, aumentando la probabilidad de que células previamente iniciadas en el proceso de carcinogénesis, proliferen y progresen hacia la formación de neoplasias. Esta posibilidad ha incitado a realizar diferentes intentos por demostrar las respuestas inducidas por CEM-EBF *in vitro* (véase Tabla 4). Algunos de los estudios celulares *in vitro* que se han realizado son: señalamiento por Ca^{2+} , actividad de la Ornitina Descarboxilasa, síntesis de RNA y DNA, expresión de genes, proliferación celular, crecimiento de neuritas, etc. (Lacy-Hulbert y cols., 1998).

Tabla 1. Ejemplos de algunos estudios epidemiológicos que investigan la relación entre cáncer y la exposición residencial de CEM (modificado de Lacy-Hulbert, 1998).

	Conclusión	Número de casos	Riesgo de cáncer	Estimado del riesgo (95% IC)
Wertheimer y Lepper, 1979	Aumento del riesgo de cánceres, leucemias y tumores cerebrales	344	Todo tipo de cáncer Leucemia Tumores cerebrales	2.25 (1.6-3.5) 2.98 2.4
Savitz et al., 1988	Aumento del riesgo de cánceres, leucemias y tumores cerebrales	356	Todo tipo de cáncer Leucemia Tumores cerebrales	1.52(1.04-2.25) 1.54 2.04(1.11-3.76)
Tomenius, 1986	Aumento del riesgo de todo tipo de cáncer	716	Todos los cánceres Leucemia Tumores cerebrales	2.05(1.11-4.2) 0.34 3.86
London, 1991	Aumento en el riesgo de leucemia	232	Leucemia	1.68 (1.1-2.5)
Lin y Lu, 1989	Sin aumento de riesgo	216	Todo tipo de cáncer Leucemia Tumores cerebrales	1.30(0.92-1.84) 1.31(0.72-2.21) 1.09(0.50-2.37)

Fulton et al., 1980	Sin aumento de riesgo	119	Leucemia	1.09 (0.7-1.6)
Myers et al., 1989	Sin aumento de riesgo	374	Todo tipo de cáncer Leucemia	0.98 1.14
Olsen et al., 1993	Alguna evidencia en el aumento de riesgo de todo tipo de cáncer	1707	Todos los cánceres Leucemia Tumores del SNC Linfomas	5.6(1.6-19) 6.0(0.8-44) 6.0(0.7-44) 5.0(0.3-82)
Verksalo et al., 1993	Sin aumento de riesgo	140	Todo tipo de cáncer Tumores de SNC Leucemia Otros cánceres	1.5(0.74-2.7) 2.3(0.75-5.4) 1.6(0.32-4.5) 1.2(0.26-3.6)
Feychting y Ahlbom, 1993	Alguna evidencia en el aumento de riesgo de leucemia infantil, pero no en otros tipos de cáncer	142	Leucemia infantil Tumores del SNC Todos los cánceres	2.7(1.0-6.3) Sin aumento de riesgo Sin aumento de riesgo
Feychting y Ahlbom, 1994	Sin aumento de riesgo en cánceres de adulto	548	Tumores del SNC Leucemia adulta	Sin aumento de riesgo Sin aumento de riesgo
Severson, 1988	Sin aumento de riesgo de leucemia	133	Leucemia aguda	1.8(0.8-2.9)
Youngson et al., 1991	Sin aumento de riesgo de leucemia o linfoma	3144	Leucemia o linfoma	1.27(0.97-1.66)

Tabla 2. Algunos estudios de los CEM como agentes mutagénicos (modificado de Lacy-Hulbert, 1998).

Blanco	Sistema experimental	Condiciones de exposición a CEM	Resultado	Ensayo	Autor
---------------	-----------------------------	--	------------------	---------------	--------------

Mutación al DNA	Salmonella	15-30 mT, 0.3 Hz 1-10 μ T, 50 Hz en pulsos de 2 μ s Variedad de campos de radiofrecuencia y microondas	Sin aumento	Frecuencia de mutación	Nafziger et al., 1993
	Salmonella tratada con azida	0.2 mT, 60 Hz por 48 h	14% de aumento	Frecuencia de mutación	Tabrah et al., 1994
	Linfocitos humanos	75 o 150 μ T a 32 Hz	Aumento de micronúcleos	Formación de micronúcleos	Tofani et al., 1995
	Ratones	20 kV/m, 50 Hz 1 mT, 50 kV/m, 60 Hz	Sin efecto Sin efecto	Mutación de genes Intercambio de cromatidas	Nat. Rad. Prot. Board, 1992
Alteraciones de cromosomas	Linfocitos humanos	50 Hz, 60 Hz y pulsos de CEM	Sin efecto	Alteraciones cromosomales	Tabrah et al., 1994
	Linfocitos humanos	50 Hz, 60 Hz y pulsos de CEM	Sin efecto	Alteraciones cromosomales	Cadossi et al., 1992
	Células de hamster	30 μ T, 50 Hz	Sin efecto	Segregación cromosómica	Saalman et al., 1991

Tabla 3. Ejemplos de estudios sobre los efectos de los CEM en la producción de radicales libres
(modificado de Lacy-Hulbert, 1998).

Sistema experimental	Condiciones de exposición a CEM	Resultado	Ensayo	Autor
B12 etanolamina amonía liasa	>50 mT, efectos máximos a 100 mT, campos estáticos	Disminución en la actividad	Detección espectroscópica de productos de reacción	Harkins y Grissom, 1994
Estallido respiratorio	0.1 mT, 60 Hz	Aumento en el	Detección por	Roy et al., 1995

de Neutrofilos		superóxido	fluorescencia de productos superóxido	
Producción de NO por macrófagos	Campos estáticos de 1-100 mT o 1.6 mT	Sin efecto	Medida de nitrito	Mnaimneh et al., 1996

Tabla 4. Ejemplos de estudios *in vitro* sobre los efectos de los CEM en sistemas biológicos (modificado de Lacy-Hulbert, 1998).

Sistema experimental		Condiciones de exposición a CEM	Resultado	Ensayo	Autor
Síntesis de DNA	Linfocitos estimulados	2.5 mT, 50 Hz 6 h	Aumento	Incorporación de timidina	Cossarizza et al., 1989
Proliferación celular	Linfocitos estimulados	5 mT, 50 Hz	Aumento	Entrada a la fase S	Rosenthal y Obe, 1989
	Linfocitos estimulados	4,5 mT 3 Hz 6 mT, 3 Hz	Disminución Disminución	Número celular	Conti et al., 1983
	Células de cáncer de mama tratadas con tamoxifen y melatonina	1.2 μ T, 60 Hz	Aumento	Número celular	Harland y Liburdy, 1994
Señalamiento por Ca^{2+}	Células Jurkat	0.1 mT, 50 Hz	Aumento	Oscilaciones de Ca^{2+}	Lindstrom et al., 1993
	Linfocitos estimulados	4.5 mT, 3 Hz	Disminución	Transporte de $^{45}Ca^{2+}$	Conti et al., 1985
	Linfocitos	6.5 mT, 3 Hz 2 mT, 60 Hz	Aumento Aumento	Transporte de $^{45}Ca^{2+}$ inducido por ConA Influjo de Mn^{2+}	Walleczek et al., 1994
	Tejido cerebral		Aumento	Transporte de Ca^{2+}	Blackman et al., 1985
Actividad de la Ornitina descarboxilasa	Células de linfoma humano	1 V/m, 60 Hz	Aumento	Actividad de la ODC	Byus et al., 1987
Expresión de genes	Glándulas salivales	1 mT, 60 y 72 Hz	Aumento	Incorporación de uridina	Goodman y Henderson, 1986

1.2 Las células cromafines.

Las células cromafines tienen su origen en una población de células de la cresta neural que inicialmente se localizan en las cadenas primarias simpáticas del embrión. Se ha sugerido que cuando los simpatoblastos migran en la dirección dorsal para formar definitivamente el ganglio simpático, otros progenitores migran en la dirección ventral para aportar células a la médula suprarrenal en desarrollo. Cuando los progenitores de la cresta neural colonizan el primordio adrenal se asocian con células mesodermales que forman la corteza adrenal (Figura 1.12). En el ambiente de la glándula suprarrenal, células precursoras que sintetizan noradrenalina se convierten en células endocrinas cromafines productoras de adrenalina. La enzima responsable de esta conversión es la feniletanolamina N-metil-transferasa (PNMT por sus siglas en inglés). La inducción de PNMT se cree es disparada específicamente por hormonas glucocorticoides producidas en la corteza adrenal. (Kalcheim y cols. 2002)

Las células de la médula adrenal, han sido distinguidas de aquellas de la corteza desde mediados del siglo XIX. Una de las reacciones químicas para distinguirlas, consistía en una coloración café después de una inmersión en una solución de cromatos. Al comienzo del siglo XX, Alfred Khon utilizó el término reacción cromafin a ésta reacción colorante y células cromafines a aquellas células en las cuales dicha reacción tenía lugar. Después se encontró que la reacción cromafin era el resultado de la oxidación de catecolaminas almacenadas más que de la afinidad al cromo. Por lo tanto el sinónimo feocromocito (del griego pheos, que significa oscuro) fue introducido para aludir a la reacción sin implicar su mecanismo. Curiosamente, “célula cromafin” es el término aceptado para referirse a las células de la médula adrenal y “feocromocitoma” como el término para los tumores de células cromafines. (Tischler, 2002).

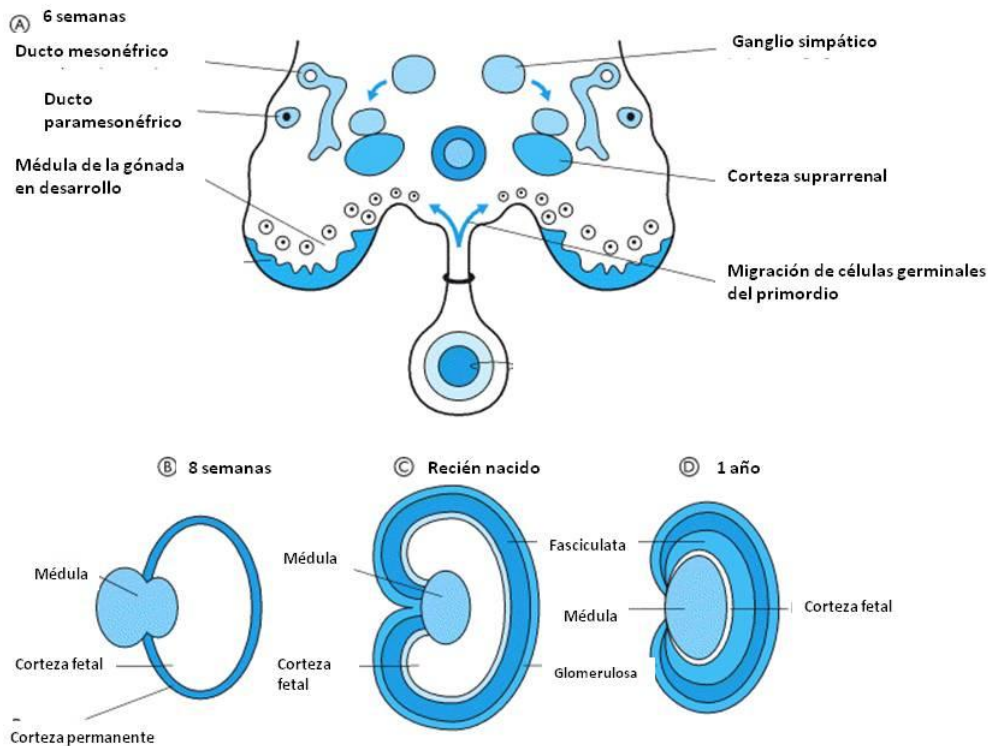


Figura 1.12 A) Diagrama de dos dimensiones de una sección transversal de la región caudal de un embrión de seis semanas. La corteza fetal suprarrenal es derivada de las células mesodermales. La médula es formada de un ganglio simpático adyacente, que es derivado de las células de la cresta neural; B) Después de que las células de la cresta neural han migrado, son envueltas por la corteza fetal y se diferencian en glándulas secretorias de la médula adrenal. Más células mesodermales rodean la corteza fetal y éstas, eventualmente, formarán la corteza adrenal adulta; C) Al nacimiento, la glándula adrenal es relativamente más grande que la adulta debido al tamaño de la corteza fetal. La zona glomerulosa y fasciculata están diferenciadas; D) Después de un año la corteza fetal ha desaparecido y la zona reticularis no será reconocible hasta el tercer años después del nacimiento.

1.2.1 Biosíntesis de las catecolaminas.

La síntesis de catecolaminas se realiza a partir de la tirosina, que puede sintetizarse en el hígado o provenir de la dieta. La reacción limitante de la biosíntesis es la conversión de tirosina en dihidroxifenilalanina, catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH). La actividad de esta enzima se inhibe por la adrenalina y noradrenalina, productos finales de la biosíntesis y se estimula por fosforilación en

respuesta a los estímulos que aumentan la secreción de catecolaminas, siendo el principal punto donde se regula la biosíntesis. La formación de dopamina se realiza en el citosol por acción de la L-aminoácido descarboxilasa (AADC), la dopamina entra en los gránulos cromafines donde es convertida en noradrenalina por la dopamina- β -hidroxilasa (DBH). De nuevo en el citosol, la feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT), introduce un grupo metilo y se completa la biosíntesis con la formación de adrenalina (véase Figura 1.14).

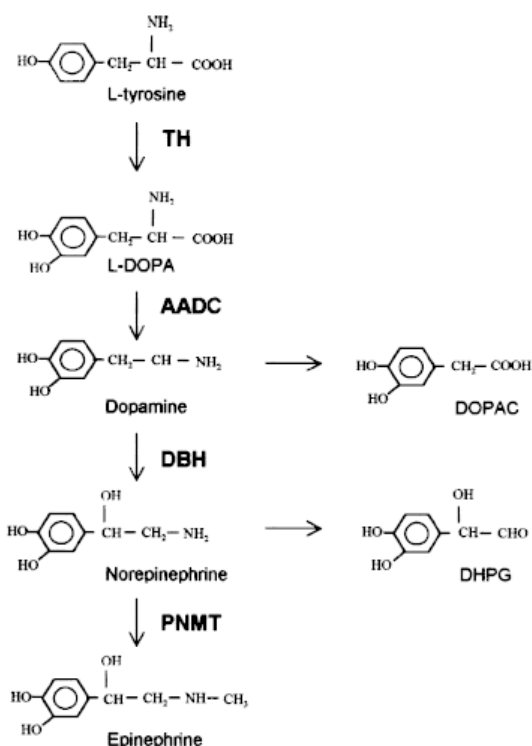


Figura 1.14. Biosíntesis de las catecolaminas.

1.2.2 Regulación de la síntesis y liberación de catecolaminas.

En el humano, el cortisol aumenta de manera selectiva el paso de noradrenalina a adrenalina, induciendo la síntesis de la PNMT, por lo que los glucocorticoides determinan la proporción de adrenalina y noradrenalina sintetizada en las células cromafines. La médula suprarrenal, al recibir la sangre de la corteza, está sometida a grandes concentraciones de cortisol por lo que, a diferencia de lo que ocurre en las neuronas simpáticas postganglionares, la adrenalina es aproximadamente el 80%

de las catecolaminas sintetizadas en la médula. De hecho, las células cromafines que se encuentran alrededor de los senos venosos corticomedulares tienen mayor proporción de adrenalina que las células próximas a las arteriolas medulares.

En los gránulos cromafines las catecolaminas se almacenan junto con el ATP en una relación aproximada de 4:1 y en una asociación con unas proteínas llamadas cromograninas. La estimulación por la acetilcolina de las neuronas preganglionares simpáticas del nervio esplácnico, aumenta la liberación de catecolaminas, ATP, DBH, y de todas las demás sustancias contenidas en los gránulos cromafines. La estimulación simpática aguda de la médula adrenal no sólo produce un aumento de la liberación de las catecolaminas, sino también aumento de su síntesis por activación de la TH y de la DBH. La adrenocorticotropina (ACTH) también estimula la síntesis de las dos enzimas mencionadas anteriormente y por último, el cortisol aumenta selectivamente la de la PNMT (Ganong, 1998).

1.2.3 Control de los niveles plasmáticos de catecolaminas.

Los niveles plasmáticos de catecolaminas son muy variables, ya que depende del estado del individuo. En un sujeto normal, en estado de reposo, la concentración plasmática de adrenalina es de aproximadamente 50 pg/mL y la de noradrenalina de 200 pg/mL. La vida media de las catecolaminas en la sangre es de aproximadamente 1-2 minutos, lo que hace que sus acciones cesen rápidamente una vez que termina el estímulo que ha desencadenado su secreción. La degradación de las catecolaminas se realiza fundamentalmente por oxidación y metilación formándose el ácido vanilmandélico, que con los demás metabolitos se elimina en la orina en forma de sulfatos y glucuronatos.

1.2.4 Las células cromafines como modelo de estudio.

Un número de factores ha contribuido para el éxito de las células cromafines como modelo de estudio. Por ejemplo, de la médula adrenal bovina, se pueden obtener poblaciones relativamente puras y grandes cantidades de células cromafines normales. Otras células neuroendocrinas normales no han sido, hasta recientemente, de fácil obtención, por lo tanto el modelo bovino aún es de amplio interés. Además del modelo bovino, la línea celular PC12 de feocromocitoma (establecida de un

tumor adrenal de rata) ha provisto de un modelo de células neoplásicas que exhiben muchas características de sus contrapartes normales.

Células cromafines, normales y neoplásicas, mantienen un interés considerable debido a su íntima -y bien descrita- relación con el sistema nervioso simpático. Estas células han sido ampliamente utilizadas en estudios de propiedades endocrinas y neuronales en general (exocitosis, diferenciación, hipoxia e incluso como modelos de desórdenes neurodegenerativos). En todas las especies estudiadas hasta ahora se ha mostrado la capacidad de que, células cromafines normales, extraídas de animales adultos o inmaduros, pueden diferenciarse o transdiferenciarse hacia un fenotipo neuronal en medios permisivos de trasplantes o cultivos. Lo mismo se ha demostrado para el modelo de feocromocitoma PC12 (Tischler, 2002). El primer trabajo en demostrar esto fue el de Unsicker, que en 1978 demostró que el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF por sus siglas en inglés) inducía el crecimiento de neuritas en células cromafines de rata en cultivo.

Las células cromafines también han sido utilizadas para el tratamiento contra el mal de Parkinson. Auto-trasplantes de células de la médula adrenal en el núcleo caudado de pacientes con la enfermedad de Parkinson han obtenido una mejoría clínica. (Madrazo, 1987). Células cromafines diferenciadas con campos electromagnéticos (CEM) también fueron utilizadas para realizar un trasplante a un paciente con la enfermedad de Parkinson, induciendo no solo un significativo mejoramiento en los síntomas clínicos sino también una significativa reducción de la medicación (Drucker-Colín y cols, 1999).

1.2.5 Células Cromafines y CEM.

En 1993, Blackman y cols. observaron, en cultivos de células PC-12, una disminución del crecimiento neurítico inducido por NGF ante la exposición de campos magnéticos de diferentes intensidades (6-30 μT) y una frecuencia constante de 50 Hz; y por primera vez se demostró, en células cromafines, que el principal responsable de estos cambios era el campo magnético y no el eléctrico. En ese mismo año, el grupo de Blackman reportó crecimiento neurítico en cultivos sin NGF de células PC-12 ante un estímulo que iba de los 2.2 a los 4 μT de intensidad y 50 Hz de

frecuencia. Esta disparidad en los resultados arriba citados es explicada (Blackman y cols, 1996), por el efecto producido de la orientación –uno respecto del otro- de los campos magnéticos de corriente alterna (CA) y directa (CD) con los que son estimulados los cultivos. Cuando la orientación de éstos es paralela, el efecto producido por la estimulación es una disminución en la neurogenización - inducida por NGF- de las células PC-12 y cuando los campos son ubicados de manera perpendicular el resultado es lo contrario: crecimiento neurítico. Este efecto fue probado satisfactoriamente tiempo después (Blackman y cols, 1998).

En 1994, Drucker Colín y cols. reportaron crecimiento neurítico de células cromafines *in vitro* similar al producido por NGF pero ante un estímulo de CM de 60 Hz y 700 μ T. Los CEM no solo facilitan el crecimiento neurítico en células cromafines, sino también promueven la formación de varicosidades neuríticas con alta formación de catecolaminas, así como la actividad eléctrica extracelular espontánea y aumento en la frecuencia de disparo (Zhan y cols, 1997). En comparación con la neurogenización inducida con NGF, la inducida con CEM presenta un mayor número de neurotúbulos que de microtúbulos y las neuritas son más rígidas y rectas (Feria Velasco y cols, 1998). Puede ser que, en el caso de la estimulación con CEM, parte de los cambios estructurales producidos estén asociados a los procesos de entrada de calcio, ya que el bloqueo de los canales de calcio de tipo L, con nifedipina, evita la diferenciación inducida por CEM, efecto que no es observado con NGF (Morgado Valle y cols, 1998). En estudios hechos tanto en células PC-12 (Obo y cols, 2002) como en células cromafines (Craviso y cols, 2003) no se han encontrado cambios en los influjos de calcio ni en la liberación de catecolaminas; sin embargo, se ha reportado que las células cromafines secretan más dopamina que adrenalina, respecto al control sin diferenciar y al diferenciado con NGF (Verdugo Díaz y cols, 1998). En un estudio realizado por Olivares-Bañuelos y cols. (2004) se intentó identificar los genes que podrían estar envueltos en la diferenciación de células cromafines por exposición a CM. De los 53 transcritos analizados se encontró una disminución de la expresión en 30 transcritos cuyos productos están relacionados a respuestas de estrés.

Tabla 5. Resultados encontrados en estudios hechos con células cromafines y PC-12 estimulados con CEM.

	Tipo celular	Hallazgo	Frecuencia	Intensidad
Blackman y cols 1993	Células PC-12	Inhibición, con CM, de la neurogenización inducida con NGF.	50 Hz por 22 h	6-30 μ T
Blackman y cols 1993	Células PC-12	Crecimiento neurítico	50 Hz; 22 h	2.2 hasta 4 μ T
Drucker Colín y cols 1994	Células cromafines	Crecimiento neurítico	60 Hz; 2h/día, 7 días	700 μ T
Shuji Ohtsu y cols 1995	Células PC-12	Aumento en la expresión de β -galactosidasa estimulada por forskolina	50 Hz; 4 h	200 y 400 mT
Blackman y cols 1996	Células PC-12	Una respuesta celular a la exposición de campos AC y DC perpendiculares diferente de la estimulación con campos AC y DC paralelos	45 Hz; 23 h	1. Perpendicular 36.6 μ T, paralelo < 0.2 μ T 2. Paralelo 36.6 μ T, perpendicular < 0.2 μ T
Feria Velasco y cols 1998	Células cromafines	Diferencias en el citoesqueleto de células diferenciadas con CM de aquéllas diferenciadas con NGF	60 Hz; 4h/día, 7 días	700 μ T
Ikehara y cols 1998	Células cromafines	Inhibición en el aumento intracelular de Ca^{+2}	3h	0.07 hasta 1.7 T
Morgado Valle y cols 1998	Células cromafines	Inhibición de la diferenciación al bloquear los canales de Ca^{+2} tipo L	60 Hz; 4h/día, 7 días	700 μ T
Drucker Colín y cols 1999	Células cromafines	El uso de células cromafines diferenciadas pueden ser utilizadas para tratar pacientes con la enfermedad de Parkinson	60 Hz; 4h/día, 10 días	700 μ T
Shah y cols 2001	Células PC-12	Inhibición, con CM, de la neurogenización inducida con NGF.	2 Hz; 2h/día, 2 días	0.3 mT
Obo y cols 2002	Células PC-12	No se detectaron cambios en el flujo de Ca^{+2}	50 Hz	65 μ T
Craviso y cols 2003	Células cromafines	No hubo cambio en la liberación de catecolaminas después de la estimulación con CM	60 Hz; 15 min.	0.01, 0.1, 1.0 ó 2 mT

Olivares Bañuelos y cols 2004	Células cromafines	Modificación de 53 transcritos en la diferenciación	60 Hz; 4h/día, 7 días	700 μ T
Schimmelpfeng y cols 2005	Células PC- 12	No se detectaron cambios en el crecimiento neurítico inducido por NGF	50 Hz; 8h/ día, 2-6 días	100 μ T

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El estudio de los efectos que los CEM producen en los seres vivos ha generado un amplio interés en el mundo científico. Los modelos de estudio han abarcado desde cinéticas enzimáticas hasta seres humanos, pasando por bacterias, cultivos celulares, etc. (véase tabla 1-4). Una característica generalizada ha sido la disparidad de los resultados reportados. Esto se debe a que la cantidad de parámetros (frecuencia, intensidad y tiempo de exposición) a escoger para la exposición es muy amplia y muchos de los estudios escogen un solo parámetro dentro de todo el espectro posible. Es común que cualquier otro grupo de trabajo, al escoger un grupo de parámetros diferentes encuentre resultados disímiles incluso en el mismo modelo de estudio. Estudios que han utilizado más de un parámetro en sus experimentos (por ejemplo diferentes frecuencias. Belyaev y cols., 2001) reportan resultados interesantes. Uno de esos resultados se refiere a que el efecto estudiado solo se observa bajo ciertas combinaciones de estos parámetros (intensidad, frecuencia y tiempo de exposición), muy cercanas unas de otras, y al variarlas ligeramente pierden su capacidad de producir dicho efecto (principalmente frecuencias). A esta manera *sui generis* de producir respuestas en los sistemas biológicos, por parte de los CEM, se le conoce como ventanas. El efecto de ventanas, es de suma importancia para poder explicar la disparidad de los resultados obtenidos en los estudios que han utilizado varios parámetros de exposición a CEM. Por otra parte el modelo de ventanas puede ser guía que indique el camino hacia un posible modelo que explique los efectos biológicos de los CEM. El primer paso será distinguir si el efecto de ventanas es observado de manera general en cualquier interacción CEM-sistemas biológicos o solo específico de algunos sistemas. En 1994, Drucker Colín y colaboradores reportaron crecimiento neurítico de células cromafines *in vitro*, similar al producido por el NGF pero ante un estímulo de CM de 60 Hz y 700 μ T. A partir de entonces, en las células cromafines se han reportado diversos efectos cuando son expuestos a CEM (véase tabla 5), aunque ningún estudio en este tipo celular ha utilizado más de una frecuencia de CEM. Si exponemos cultivos de células cromafines a diferentes intensidades y frecuencias de CEM ¿encontraremos una respuesta de tipo ventana, como ha sido reportado para otros cultivos celulares?

3. HIPÓTESIS

Los cultivos de células cromafines responderán con diferentes grados de neurogenización a la estimulación por campos magnéticos, dependiendo de la intensidad o frecuencia del estímulo; y la respuesta, de los cultivos de células cromafines, a la estimulación con campos magnéticos corresponderá a una respuesta del tipo ventana, descrito en otros sistemas.

4. OBJETIVO.

Evaluar el efecto de diferentes frecuencias e intensidades de campos magnéticos sobre cultivos primarios de células cromafines y determinar si su respuesta es de tipo ventana.

4.1 Objetivos particulares.

- Implementar los cultivos primarios de células cromafines de rata;
- Colaborar en el diseño y la creación de un sistema de estimulación magnética;
- Exponer los cultivos de células cromafines a diferentes frecuencias e intensidades de flujo de campo magnético;
- Llevar a cabo pruebas inmunocitoquímicas, con el fin de detectar el origen catecolaminérgico de las células cromafines en los cultivos, así como su neurogenización;
- Cuantificar la neurogenización inducida por NGF y por la estimulación magnética de diferentes frecuencias e intensidades;
- Medir las catecolaminas liberadas, por las células cromafines, al medio de cultivo a través de la técnica de HPLC.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivos de células cromafines.

Las células cromafines de rata fueron preparadas esencialmente como lo describió en 1985 Unisicker y colaboradores. Brevemente, glándulas adrenales fueron colectadas de ratas Wistar de 1 a 3 días de nacidas y la digestión del tejido fue llevada a cabo con colagenasa (2mg/mL, tipo I) (Worthington) en una solución salina de Spinner libre de calcio más desoxirribonucleasa I (15 µg/ml) (Sigma) durante 45 minutos a 37° C. El tejido fue mecánicamente dispersado y la suspensión celular fue centrifugada a 100 g durante 10 minutos. Las células fueron suspendidas en medio D-MEM (Gibco) adicionado con 10% de suero fetal bovino (Gibco), 4.5 µg/ml de insulina (Sigma), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de fungizona (Gibco). La viabilidad celular fue medida por el método de exclusión con azul de tripano y fue de al menos 85%. Medio millón de células cromafines fueron sembradas en platos Costar de 35 mm. Las células fueron mantenidas en cultivo por 7 días en una atmósfera húmeda 5% CO₂-95% aire a 37°C y el medio de cultivo fue cambiado cada 3 días.

5.2 Exposición de las células cromafines al campo magnético.

5.2.1 Exposición de células cromafines a campos magnéticos con el dispositivo prototipo.

Los cultivos de células cromafines fueron divididos en tres grupos. El primer grupo fue el grupo control, al cual no se le adicione NGF en el medio ni se expuso a CEM. Al segundo grupo se le adicionó NGF (100 ng/ mL) (Sigma) desde el primer día de cultivo y se fue agregando la misma cantidad cada tercer día. El tercer grupo fue sometido a campos magnéticos.

En nuestro grupo de trabajo, anteriormente, se habían utilizado bobinas en configuración Helmholtz como fuente de generación de campos magnéticos, con los que se estimulaban cultivos primarios de células cromafines (Drucker-Colín y cols., 1994; Verdugo-Díaz y cols., 1998, Morgado-Valle y cols., 1998 y Olivares-Bañuelos y cols., 2004). En todos estos estudios se utilizó solamente un parámetro: 60 Hz y 700 µT. Debido a que en las bobinas no existe la variabilidad requerida en la elección de los parámetros, fue necesario reemplazar la utilización de bobinas como fuente de CEM necesarios para la exposición de células cromafines Durante la primera parte del presente estudio se adaptó, junto con un ingeniero en electrónica, un sistema de estimulación magnética capaz de generar

campos magnéticos de intensidades y frecuencias variables. Para llegar al diseño final del sistema (dispositivo) se realizaron una serie de pruebas previas con un prototipo diseñado para probar en primera instancia que al utilizar un rehilete mecánico como estimulador magnético se pueden obtener resultados similares a los arrojados al utilizar electroimanes –como las bobinas Helmholtz. También se buscó identificar las mejoras y necesidades del sistema con el fin de optimizar los resultados. El sistema de estimulación utilizado consta de un rehilete mecánico de acrílico y un sistema de control electrónico. El rehilete, esta compuesto de una pinza en la cual van incorporados un par de imanes de ferrita rectangulares de 5cm largo, 3cm de ancho y 1cm de espesor. Las frecuencias del giro eran 3, 5.5, 10, 14 y 17.3 Hz y no se controlaba el tiempo de duración del estímulo. El prototipo no incluía un magnetómetro, ni un sistema para regular la frecuencia del giro. El objetivo principal de este prototipo fue el de comprobar que utilizando imanes permanentes se pueden obtener resultados similares que con el uso de electroimanes, además de ajustar el sistema y adecuarlo para los experimentos requeridos.

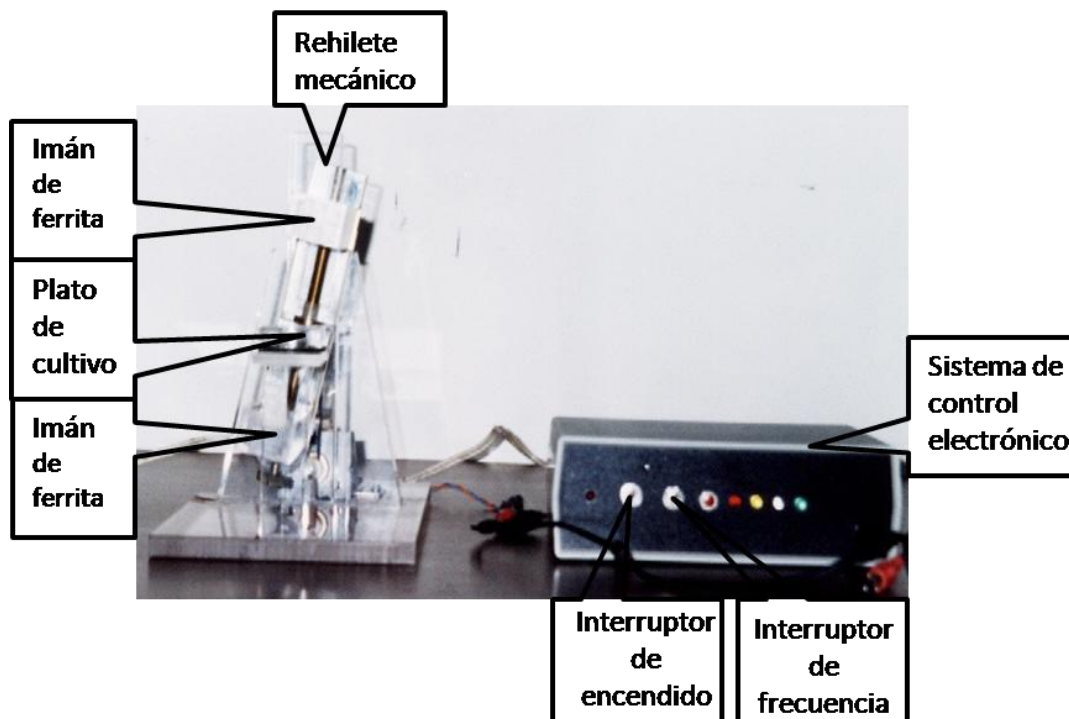


Figura 4.1. Fotografía del prototipo del sistema estimulador por campos magnéticos. Se muestran los principales componentes del mismo.

Utilizando un magnetómetro de flujo de la marca Lutron, modelo EMS-287, se elaboró una tabla (Tabla 6) de correspondencia entre la frecuencia, la intensidad de flujo magnético y la distancia entre los imanes.

Tabla 6. Mediciones de la intensidad de flujo magnético obtenidas con el prototipo, en ellas se observan las cuatro frecuencias a las cuales gira el sistema y el rango en distancia entre los imanes que alcanza la pinza. En los casos donde aparece “>2000 μ T” significa que sobrepasó el rango del medidor de intensidad de campo y por ello no se pudo determinar la intensidad. Las mediciones se hicieron con los imanes en polaridades N-S.

Distancia (cm)	Frecuencia(Hz)			
	5.5	10	14	17.35
2.8	1178 μ T	2000 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
2.9	1010 μ T	1980 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3	995 μ T	1790 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.1	985 μ T	1750 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.2	965 μ T	1675 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.3	960 μ T	1665 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.4	930 μ T	1615 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.5	925 μ T	1585 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.6	915 μ T	1580 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.7	900 μ T	1515 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.8	895 μ T	1480 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
3.9	875 μ T	1500 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
4	870 μ T	1430 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
4.1	865 μ T	1434 μ T	>2000 μ T	>2000 μ T
4.2	858 μ T	1400 μ T	1970 μ T	>2000 μ T
4.3	840 μ T	1380 μ T	1930 μ T	>2000 μ T
4.4	850 μ T	1380 μ T	1900 μ T	>2000 μ T
4.5	830 μ T	1400 μ T	1850 μ T	>2000 μ T
4.6	828 μ T	1370 μ T	1785 μ T	>2000 μ T
4.7	830 μ T	1375 μ T	1785 μ T	1985 μ T

Debido a que el sistema se hacía inestable al utilizar las frecuencias de 10, 14 y 17.3 Hz; ya que a mayor frecuencia el rehilete comenzaba a vibrar y deslizarse dentro de la incubadora, impidiendo el correcto funcionamiento del rehilete. Por este hecho, se optó por usar el sistema para los experimentos preliminares, solo a la frecuencia de 5.5 Hz con las intensidades de 830 y 1178 μT , durante 2 horas diarias durante siete días, comenzando con la exposición a partir del segundo día de cultivo.

5.2.2 Exposición de células cromafines a CM con el dispositivo mejorado.

Una vez comprobados la efectividad del dispositivo prototipo, se procedió a rediseñar el sistema estimulador incorporándole el magnetómetro y los elementos de control. Con este nuevo sistema estimulador, se consiguió tener control sobre la frecuencia de giro.

Asimismo, al incorporar un magnetómetro, la intensidad del flujo magnético es medida durante todo el experimento, lo que no sucedía con el prototipo. El sistema electrónico consta de un medidor de intensidad de flujo magnético (gaussómetro) de corriente alterna y corriente directa (CA y CD) con un rango de -200mT (-2000G) a 200mT (2000G), un sistema de control compuesto por un frecuencímetro, un control de velocidad y un temporizador. Además cuenta con una mesa para colocar el cultivo a estimular, un motor con sistema de poleas y banda dentada para el movimiento de giro del rehilete.

El sistema estimulador cuenta con 12 frecuencias diferentes (1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 Hz), de las cuales el usuario puede seleccionar una a la vez. Asimismo, el temporizador con el cual cuenta, puede programarse en eventos de 2, 4, 6 y 8 horas de duración por día; además que dichos eventos pueden repetirse durante 1, 3, 5, y 7 días.

De esta manera, los cultivos de células cromafines del grupo experimental fueron expuestos a un CM con los siguientes parámetros: 6.4 mT de intensidad de flujo y frecuencias de 4, 7, 10 ó 12 Hz, durante 2 horas diarias a lo largo de siete días, comenzando con la exposición a partir del segundo día de cultivo.

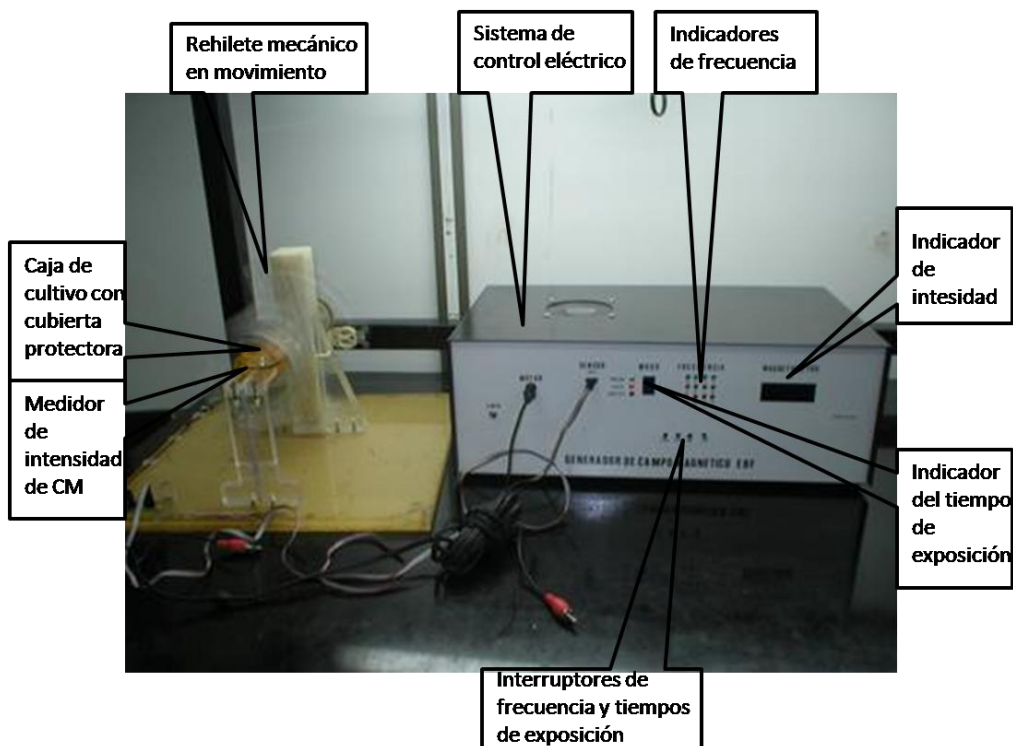


Figura 4.2. Vista frontal del sistema estimulador completo, a la izquierda el rehilete mecánico y a la derecha el sistema electrónico, ambos conectados por los cables del motor y del sensor.

5.3 Inmunocitoquímica.

Al octavo día, los cultivos de células cromafines fueron procesados para examinar la presencia de la enzima TH usando la técnica peroxidasa-antiperoxidasa. Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M con 0.9% de NaCl (PBS), pH 7.4 durante 20 minutos y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% más 1% de suero normal de cabra (Vectastain Abc, Kit Vector) en PBS 0.01M pH 7.4. Las células fueron expuestas durante 12 horas al anticuerpo de conejo anti-TH (1:1000) a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas e incubadas en anti-IgG de conejo hecho en cabra (1:200) por 2 horas, lavadas nuevamente y reveladas utilizando el sistema de complejo avidina-biotina peroxidasa, con diaminobenzidina como cromógeno (Vectastain ABC, Kit, Vector Labs Inc).

5.4 Cuantificación de la neurogenización.

La cuantificación de la neurogenización producida en células cromafines TH-positivas (TH+) se realizó con la ayuda del microscopio invertido de contraste de fase. Se contaron 30 campos tomados aleatoriamente por cada plato de cultivo (figura 4.3), bajo los cuales se contaron el número total de células TH+ que emitían neuritas y cuya longitud fuera mayor al diámetro de una célula. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células que emiten neuritas con respecto al número total de células en cada plato. Cada condición experimental es el promedio de los valores obtenidos de 30 campos, correspondientes al menos a 4 experimentos diferentes.

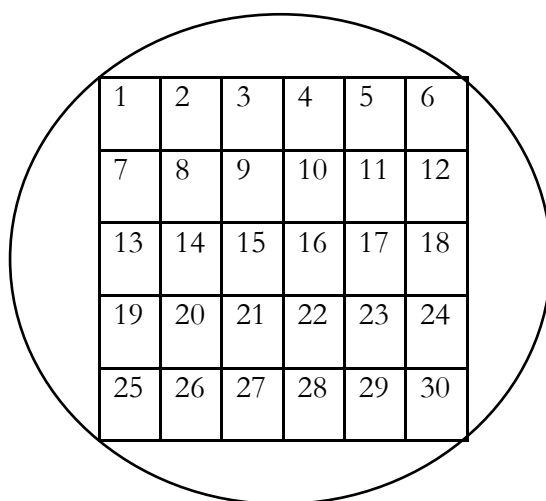


Figura 4.3. Esquema que muestra la división imaginaria de los platos de cultivo en campos para la cuantificación de las células cromafines. Cada cuadro equivale a un campo.

5.5 Análisis de catecolaminas.

El análisis de catecolaminas se hizo de acuerdo a lo reportado por Verdugo-Díaz y cols (1998). Brevemente, al séptimo día de cultivo, el medio fue removido, centrifugado y el sobrenadante fue diluido uno a diez con 0.1 M de ácido perclórico (PCA). El medio fue analizado para obtener el contenido de catecolaminas usando la detección por HPLC-ED. La fase móvil fueron 475 ml de una solución acuosa que contenía 4.7 g de ácido monocloroacético (0.1M), 75 mg de octilsulfato de sodio (223 mM) y 93 mg de EDTA (0.5M). El pH fue ajustado a 3.2 y finalmente fueron adicionados 24

ml de acetonitrilo y 4 ml de tetrahidrofurano. Antes de usar, la fase móvil fue filtrada. 5 μ l de la muestra fueron inyectados para el análisis usando un autoinyector Rheodine 712S. La detección electroquímica fue llevada a cabo usando un detector prototipo BAS 4C (EDC) 650 mV vs. Ag/AgCl, electrodo de carbón.

5.6 Análisis estadístico.

Los datos se analizaron con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y son expresados como la media \pm EEM. Los análisis estadísticos fueron realizados usando Microsoft Excel 2007. La diferencia de las medias fue considerada significativa si la probabilidad de que fuera debido a variaciones al azar, P, fue menor a 0.05.

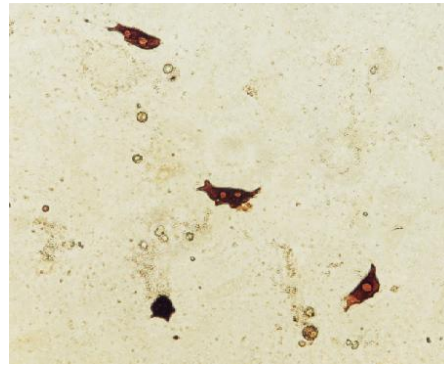
5. RESULTADOS.

5.1 Inmunocitoquímica de las células cromafines en cultivo.

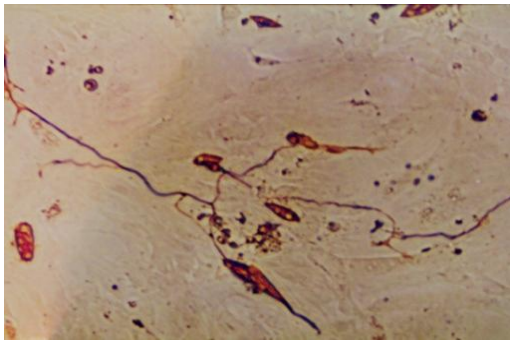
Los cultivos de células cromafines de rata en cualquiera de las condiciones realizadas (Control, NGF o CM) y de los dispositivos utilizados (prototipo o mejorado) presentaron un patrón característico de células catecolaminérgicas, manifestado por su inmunorreactividad a TH. Su apariencia morfológica y su inmunorreactividad a TH fueron similares a la descrita por otros autores (Drucker-Colín y cols. 1994). Las células crecidas en presencia de NGF mostraron un crecimiento neurítico como anteriormente había sido reportado (Unsicker y cols., 1978). Las células expuestas a CM, a diferencia de aquellas expuestas a NGF, mostraron neuritas más rectas y no formaron redes, en concordancia con lo reportado por Feria-Velasco y cols., en 1998 (figura 5.1).

5.2 Distribución de las células cromafines en los platos de cultivo.

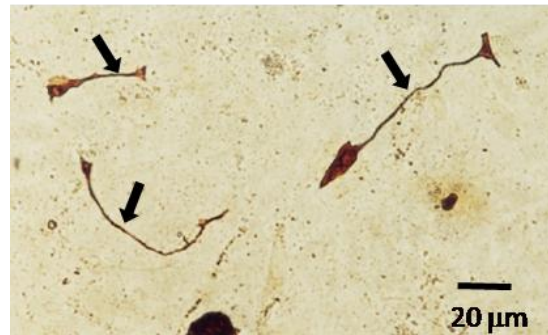
Al tomar aleatoriamente los 30 campos de cada plato de cultivo estimulado con CM, con el fin de realizar el conteo de las células cromafines inmunorreactivas a TH, se observó que la distribución de las células no era uniforme sobre toda el área del plato de cultivo, sino que existía un mayor número de células cromafines en la periférica de la caja que en el centro. La observación con el microscopio de contraste de fase y el objetivo 10x nos muestra que las células cromafines se agruparon de tal forma que el centro del plato de cultivo tenía muy pocas células con respecto a la periferia del mismo (Figuras 5.2 y 5.3). Además, las células cromafines agrupadas en las orillas del plato siguieron, en su acomodo, un patrón de espirales semejando las líneas de fuerza de un CM (Figura 5.4). Distribución que no fue observada en las otras condiciones experimentales.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.1. Fotomicrografías (20x) de cultivos de células cromafines inmunomarcadas con TH (a) Cultivo control, morfología típica de las células cromafines. (b) Cultivo diferenciado con NGF, se observa una clara diferenciación de las células. (c) Cultivo estimulado con un CM de 5.5Hz y 1180 μ T, en éste existe una diferenciación en menor grado que con el NGF. Las flechas indican las neuritas que crecieron.

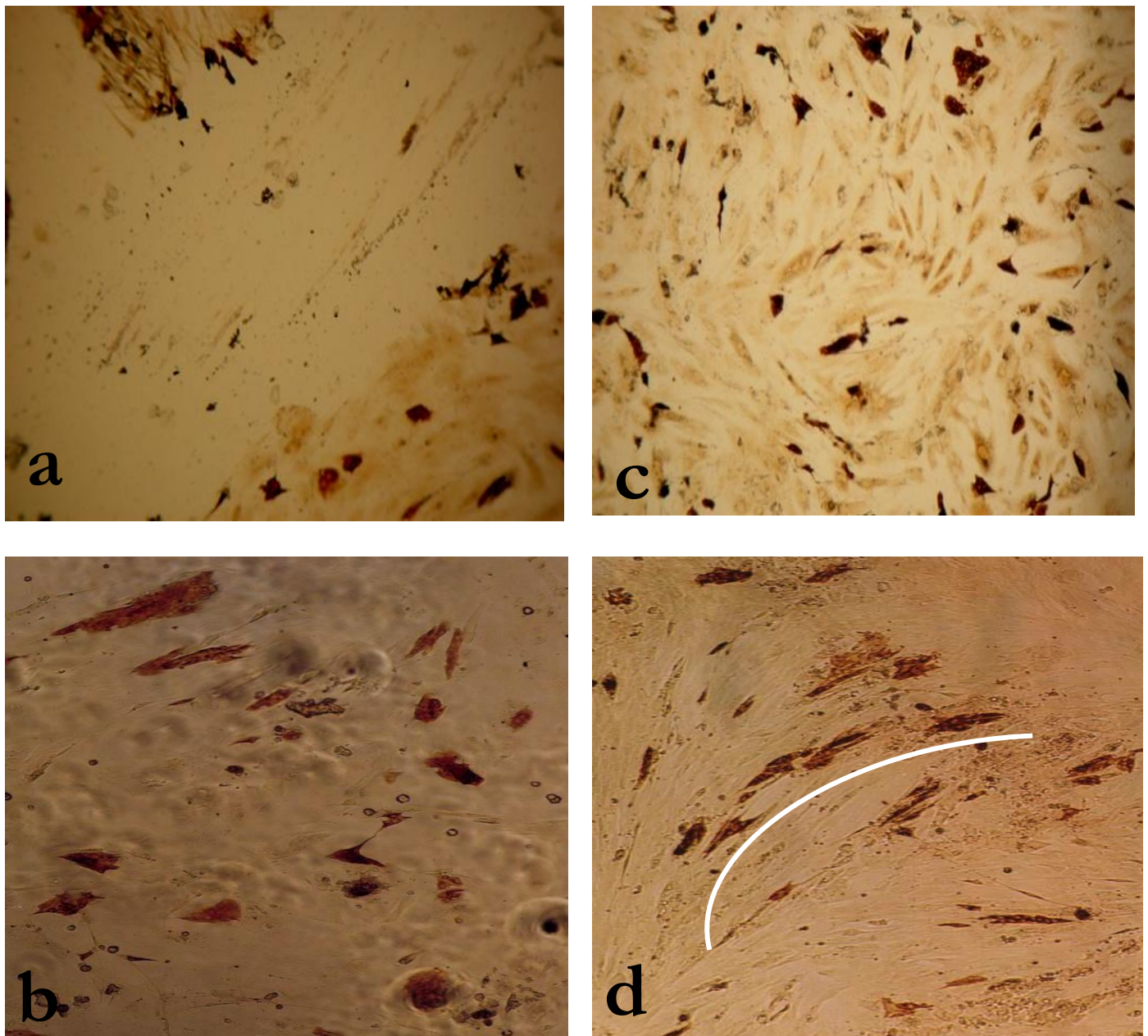


Figura 5.2. Fotomicrografías de un cultivo de células cromafines estimuladas con CM e inmunoreactivas a TH (20x). La columna izquierda muestra dos imágenes (a y b) del centro del plato de cultivo, donde se observa una menor población. (c) y (d) son fotomicrografías de la periferia del plato de cultivo, donde se muestra una mayor población de células TH positivas así como la formación de espirales, señalada en (d).

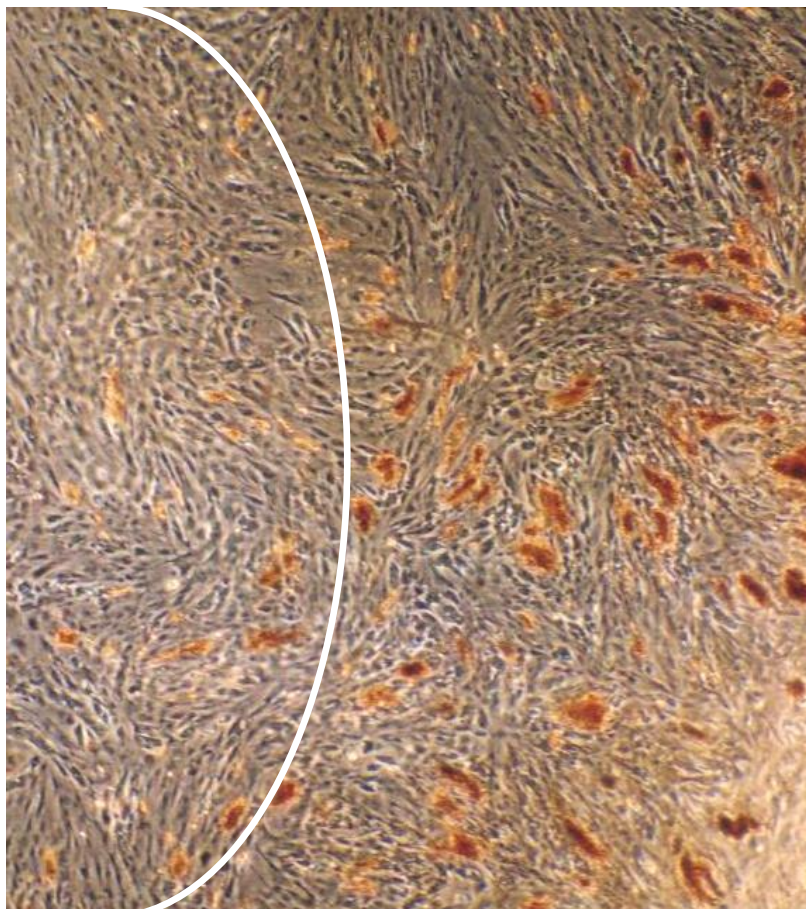


Figura 5.3 Fotomicrografía de un cultivo de células cromafines estimuladas con CM e inmunoreactivas a TH (10x). Se muestra parte del centro (izquierda y separada por una línea) y la periferia (derecha) del mismo.

5.3 Análisis de catecolaminas

Se analizaron las catecolaminas liberadas al medio de cultivo del grupo control y del expuesto a un CM de $1180 \mu\text{T}$ y 5.5 Hz de frecuencia (con el prototipo). La cantidad de dopamina encontrada en el grupo estimulado con CM, muestra una tendencia al aumento ($725.66 \pm 96.72 \text{ f mol}/5 \mu\text{l}$, $n=4$) respecto al control ($541.33 \pm 143.05 \text{ f mol}/5 \mu\text{l}$, $n=4$), aunque no es estadísticamente significativa la diferencia. La cantidad de las otras catecolaminas analizadas (adrenalina y noradrenalina) no mostraron diferencia alguna respecto al grupo control (Figura 5.5). No se continuaron analizando las catecolaminas en los siguientes cultivos realizados tanto con el prototipo como con el dispositivo mejorado, debido a la falta de diferencia significativa observada en este experimento.

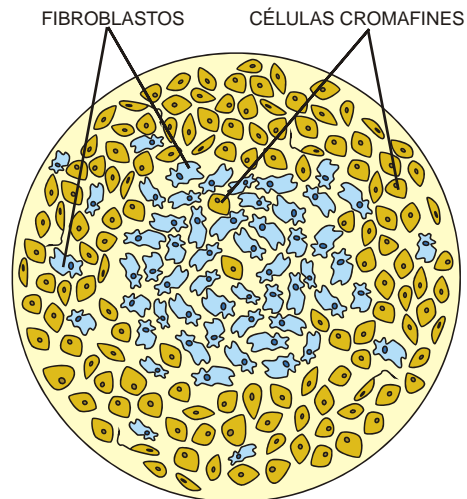


Figura 5.4 Esquema de la distribución de las células cromafines (de forma romboide o triangular) y de los fibroblastos (de forma irregular) después de aplicar el estímulo de CM. Se puede observar como las células cromafines se ordenaron preferentemente en la periferia de la caja de cultivo, mientras que los fibroblastos se agruparon en el centro.

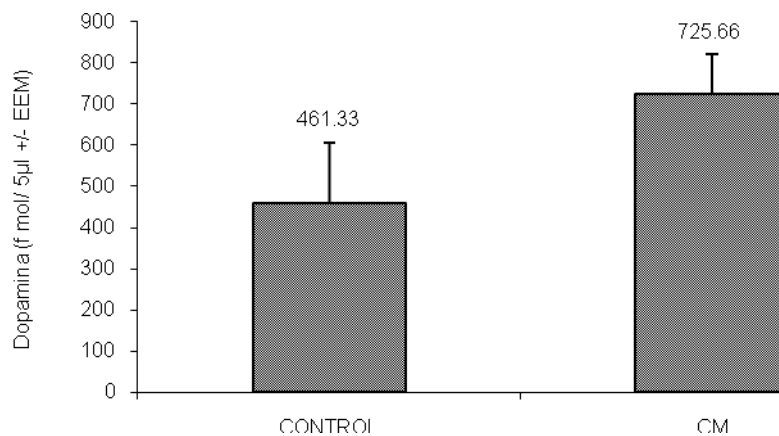


Figura 5.5 Gráfica que muestra el promedio de la concentración de dopamina (fmol/5 µl de muestra) en el medio de cultivo de células cromafines. El análisis se realizó mediante HPLC-ED. La cantidad de dopamina en el grupo estimulado con un CM de 5.5 Hz y 1180 µT (n=4) presentó una tendencia al aumento que no fue significativa respecto al grupo control.

5.4 Neurogenización de células cromafines con el dispositivo prototipo.

Los cultivos expuestos a un CM de 5.5 Hz y 830 μT no mostraron una diferencia en la neurogenización de las células cromafines con respecto al grupo control (20.44% \pm 4.2, n=4 y 19.28% \pm 4.37, n=4 respectivamente). Aquellos cultivos estimulados con una frecuencia de 5.5 Hz y 1180 μT mostraron un aumento significativo en la neurogenización (36.75 \pm 2.62, n=4) comparado con el grupo control y con aquel expuesto a 830 μT ($F = 11.71$, $P < 0.05$) (Figura 5.6).

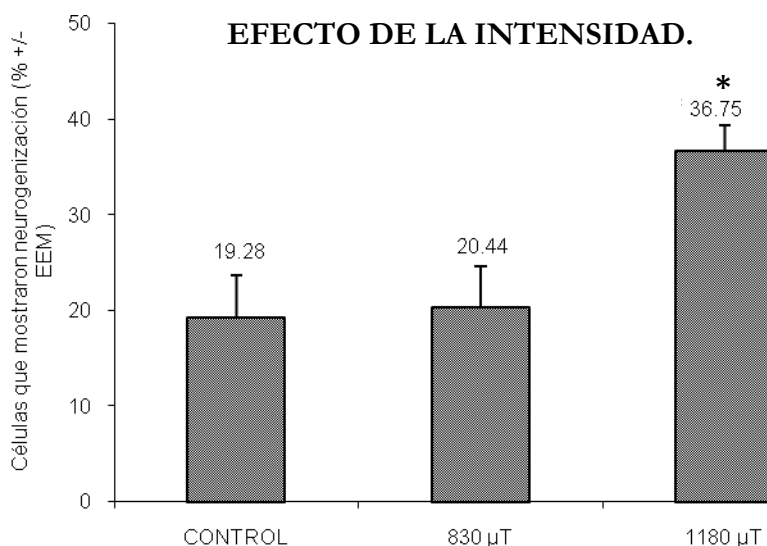


Figura 5.6 Gráfica que ilustra el promedio del porcentaje de células cromafines neurogenizadas. Las células cromafines fueron cultivadas y estimuladas durante 7 días con un CM de 5.5 Hz y 830 ó 1180 μT . Al finalizar el tratamiento las células fueron inmunomarcadas con anti-TH y calculado el porcentaje de células que produjeron neuritas con respecto al número total de células. (* $P < 0.05$)

5.5 Neurogenización de células cromafines con el dispositivo mejorado.

Los cultivos expuestos a 4 Hz no mostraron una neurogenización diferente a la del grupo control (31.63% \pm 2.5, n=4 y 26.85% \pm 5.6, n=10 respectivamente). Por el contrario, se observó un aumento

en la cantidad de neurogenización en los cultivos de los grupos estimulados con 7 y 10 Hz. La cantidad de neurogenización fue similar entre ellos ($63.53\% \pm 3.6$, $n=4$ y $64.61\% \pm 12.5$, $n=4$ respectivamente), y estadísticamente diferente del grupo control ($F=19.52$, $P < 0.05$). La diferenciación producida a 7 y 10 Hz no fue muy diferente de la promovida por el NGF ($58.84\% \pm 8.6$, $n=5$). La neurogenización observada en el grupo estimulado con una frecuencia de 12 Hz ($37.6\% \pm 4.2$, $n=4$) no fue estadísticamente diferente de la de los grupos control y 4 Hz, pero si es diferente de la frecuencias de 7 y 10 Hz ($F= 21.43$, $P < 0.05$). Es de resaltar que la respuesta de las células cromafines al CM no fue dosis-dependiente, esto es que no se vio una respuesta mayor -expresada en aumento de la neurogenización- a mayor frecuencia de CM; sino que por el contrario la neurogenización alcanzó sus valores máximos a 7 y 10 Hz, para posteriormente decaer hasta el valor control con la frecuencia mayor utilizada de 12 Hz (Figura 5.7).

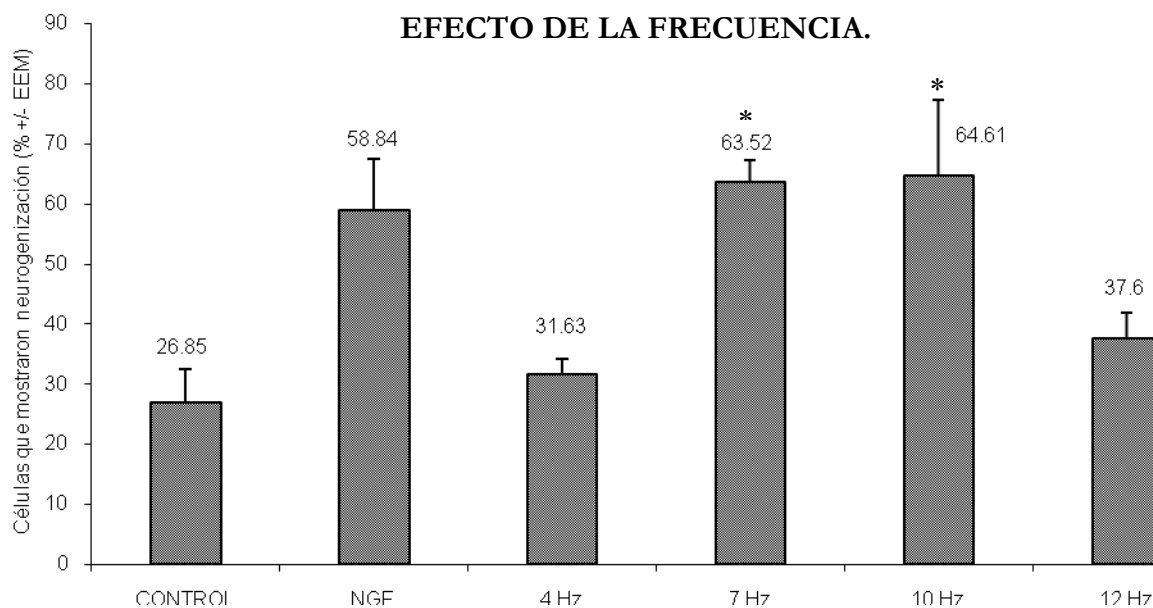


Figura 5.7 Gráfica que ilustra el promedio del porcentaje de células cromafines neurogenizadas. Las células cromafines fueron cultivadas en presencia de NGF o estimuladas durante 7 días con un CM de 6.4 mT de intensidad y 4, 7, 10 ó 12 Hz de frecuencia. Al finalizar el tratamiento las células fueron inmunomarcadas con anti-TH y calculado el porcentaje de células que produjeron neuritas con respecto al número total de células (* $P < 0.05$ versus el grupo control).

6. ANALISIS Y DISCUSION DE DATOS.

6.1 Análisis de catecolaminas.

En 1998 Verdugo Díaz y colaboradores, demostraron que la neurogenización de células cromafines inducido con CEM de 60 Hz y 0.7 mT, indujo cambios en los niveles de catecolaminas. Los autores reportaron un aumento en la cantidad de dopamina y una disminución en la de adrenalina de dichas células. Debido a lo relevante de la información arriba citada, para el presente trabajo se decidió determinar la cantidad de catecolaminas liberadas al medio de cultivo. No encontrando la suficiente contundencia en los resultados, las pruebas solo se realizaron en los experimentos iniciales (aquellos que utilizaron al dispositivo prototipo). En el medio de cultivo de las células estimuladas con el CM que indujo neurogenización (5.5 Hz y 1180 μ T) se encontró una tendencia al aumento de los niveles de dopamina. Aunque no es una diferencia estadísticamente significativa, si hay congruencia con el trabajo de 1998 antes citado. En lo que no se halló concordancia fueron en los niveles de adrenalina y noradrenalina liberadas al medio de cultivo. El hecho de que las células cromafines neurogenizadas con CM, no solo muestren una morfología del tipo neuronal sino que además secreten dopamina y noradrenalina, complementa el cambio de un fenotipo endocrino hacia uno neuronal. Aunque en nuestros resultados solo observamos una ligera tendencia al cambio del tipo de catecolaminas secretadas por las células cromafines diferenciadas con CM, quedará por determinar los valores de los parámetros de CM óptimos para lograr el mayor cambio, en particular aumentando la liberación de dopamina a expensas de adrenalina. Esto ayudaría a mejorar la eficiencia en el uso de estas células –que ya han sido utilizadas– en terapias contra enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, y lograr así una mejoría mayor a la reportada (Drucker-Colín R y cols., 1999).

6.2 Morfología y distribución de las células cromafines en cultivo.

Al observar la neurogenización producida ya sea por NGF o por los CM salta a la vista la diferencia entre estas. Feria Velasco y colaboradores (1998) abordan el tema y descubren diferencias de estructura en las redes de neurogenización producidas por uno y otro estímulo. La composición del citoesqueleto en las células neurogenizadas con NGF mostró un crecimiento de filamentos intermedios y sus neuritas fueron de forma irregular con patrones altamente ondulados. Mientras que aquellas células estimuladas con CM, sus neuritas fueron más rígidas y rectas.

Lo reportado en nuestros experimentos respecto a la morfología de las células cromafines neurogenizadas con NGF o CM fue semejante a lo anteriormente descrito, como se puede apreciar en la figura 5.1. Cuando observamos la morfología de las células cromafines de los cultivos estimulados con CM, no hubo diferencia en las formas de las neuritas entre los diferentes parámetros de intensidad y frecuencia, que produjeron neurogenización, pero sí en el porcentaje de células que se neurogenizaron (ver discusión mas adelante). El hecho de que la neurogenización a través de CM parezca (estructuralmente) similar sin importar el parámetro que la genere nos indica que, posiblemente, podría estar envuelto el mismo mecanismo y que, como ha sido comprobado (Morgado-Valle y cols., 1998), es diferente de aquel inducido con NGF.

La distribución heterogénea de las células en los platos de cultivo expuestos a CM, con mayor densidad de población en las periferias, así como la agrupación en forma de espirales de las células en cultivo, es un hallazgo que al parecer no ha sido reportado en células cromafines (Figura 5.2 y 5.3). Esto nos lleva a pensar que en el medio de cultivo se pueden formar corrientes inducidas por el CM, que puedan promover la distribución particular de las células. Por otro lado, se han encontrado tanto en tejidos de animales como de humanos, tanto magnetita (Fe_3O_4) como griegita (Fe_3S_4 , sulfido de hierro), materiales que aún no se sabe a ciencia cierta cual es su función dentro de las células que los contienen. Salvo ciertos ejemplos, en particular de bacterias como el caso de la *Aquaspirillum magnetotacticum*, que es una bacteria acuática que utiliza el campo magnético terrestre para orientarse y conducirse a través de los diferentes niveles de concentración de oxígeno en su hábitat, necesario para su subsistencia (Johnson y cols., 1997). Si las células cromafines tuvieran también partículas de magnetita, entonces quizás, la distribución observada en los cultivos utilizados, pudiera también ser explicada por la influencia del campo magnético sobre estas partículas, como ha sido observada en las magnetobacterias.

6.3 Neurogenización de células cromafines. Respuesta de tipo ventanas.

El termino ventana se define como un rango -de frecuencia, intensidad o tiempo de exposición- en el cual el sistema muestra sensibilidad (Litovitz y cols., 1992). Se han reportado varios trabajos donde este tipo de respuesta es observado. Los estudios incluyen desde soluciones químicas hasta ciertas funciones animales. Por ejemplo, Zhadin y colaboradores (1998) reportaron que un CM afecta la

corriente iónica de una solución de ácido glutámico, encontrando una respuesta máxima entre 1 y 10 Hz y 40 μ T. En ensayos enzimáticos (Portaccio y cols., 2005), se observó que la actividad de la peroxidasa de rábano muestra un pico de interacción positivo a 130 Hz y 1 mT dentro de un rango que abarcaba desde los 50 hasta los 250 Hz. Entre los estudios en animales, podemos mencionar un estudio sobre el desarrollo embrionario de pollos (Lahijani y Ghafoori, 2000) donde el porcentaje máximo de anomalías del desarrollo fueron encontradas a 50 Hz y 8 mT, donde el rango fue de 8 a 10 mT. Al medir cambios conformacionales de la cromatina de *E. coli*, Belyaev y Alipov (2001) encontraron dos ventanas de frecuencia a 9 y 16 Hz dentro de un rango de 6 a 24 Hz. Al realizar el mismo estudio en linfocitos humanos encontraron ventanas muy similares a las encontradas en bacterias, lo que sugiere blancos similares en distintos tipos celulares.

Los resultados obtenidos en el presente estudio –cantidad de neurogenización– al estimular cultivos de células cromafines con CM de frecuencias 4, 7, 10 y 12 Hz y una intensidad de 6.4 mT nos permiten señalar que el efecto producido es dependiente de la frecuencia, con respuesta máxima a 7 y 10 Hz, y que ésta es una respuesta de tipo ventana. Hasta el momento este es el primer trabajo en reportar una ventana de frecuencia en cultivos de células cromafines. Con este trabajo se establece un precedente que arroja luz sobre los mejores parámetros de exposición de CEM -como inductor no invasivo de neurogenización– para lograr un máximo de diferenciación en células cromafines, en vista de su utilidad en terapias para enfermedades neurodegenerativas. En el presente estudio se logró una neurogenización pico a 6.4 mT con 7 y 10 Hz del 64%, porcentaje mayor a la producida por CEM generados por bobinas y reportada en 1994, la cual fue del 40% (Drucker-Colín y cols., 1994). Por otro lado, el establecer que las células cromafines responden a un patrón del tipo ventana es de gran ayuda para esclarecer la disparidad de resultados encontrados (véase tabla 5) y tomar en cuenta los parámetros utilizados y la importancia de utilizar más de uno, en lugar de descalificar los hallazgos encontrados entre laboratorios, hecho bastante común en bioelectromagnetismo (Craviso y cols., 2003). El dispositivo diseñado y utilizado en nuestro grupo de trabajo fue capaz de sustituir las bobinas - normalmente utilizadas por otros grupos de trabajo incluyendo el nuestro (Verdugo-Díaz y cols., 1998)- de manera exitosa, generando un campo magnético de corriente alterna similar al rotar, alrededor del cultivo, imanes permanentes de ferrita.

6.4 Teoría sobre el mecanismo de acción de los campos magnéticos.

A la fecha, hace falta una explicación concreta sobre los efectos en sistemas biológicos de los campos magnéticos débiles, como los utilizados en este estudio. No obstante la cantidad de modelos y teorías que buscan una explicación es extensa (Funk y Monsees, 2006). En los estudios donde se reportan ventanas de frecuencia, las frecuencias que producen efectos son bastante pequeñas, desde algunas décimas de Hz (Belyaev y cols., 2001), que es el rango de frecuencias aquí utilizadas, hasta algunos cientos (Portaccio y cols., 2005). En los modelos que intentan explicar dichos efectos del ión Ca^{+2} juega un papel importante como mediador de la respuesta (Binhi, 1997). Respecto a las células cromafines, sin duda también el Ca^{+2} es un factor fundamental para el crecimiento neurítico. Se ha mostrado que el aumento en la concentración intracelular de Ca^{+2} juega un papel importante en la neurogenización de las células cromafines, ya sea inducida con NGF o CEM (Morgado-Valle y cols., 1998). Los CEM pueden disparar una entrada de Ca^{+2} a través de canales regulados por voltaje, específicamente los de tipo L, mientras que el NGF libera Ca^{+2} de pozas intracelulares. Esto puede producir respuestas celulares que causen la expresión funcional de largo plazo de canales de Ca^{+2} , el fenotipo diferenciado y la secreción potenciada de catecolaminas (Morgado-Valle y cols., 1998).

6.5 Conclusiones.

Se logró la neurogenización de células cromafines en cultivo utilizando un campo magnético de 5.5 Hz y 1178 μT ; así como de 6.4 mT de intensidad con las frecuencias de 7 y 10 Hz. La cantidad de neurogenización lograda con estos dos últimos parámetros ha sido la mayor lograda en nuestro grupo de trabajo; la respuesta ante estos parámetros de estímulo correspondió con una respuesta de tipo ventana dependiente de frecuencia. El dispositivo de estimulación, diseñado y construido por nuestro grupo de trabajo, funcionó de manera exitosa y podrá ser utilizado en estudios posteriores. Fue observada una distribución heterogénea de las células cromafines en el plato de cultivo con mayor densidad en la periferia. Los resultados obtenidos en este trabajo, son la primera vez que se reportan para cultivos de células cromafines.

6.6 Perspectivas

Quedará por determinar si la neurogenización producida, ya sea por la frecuencia o intensidad del campo magnético dispara las mismas cascadas de señalización dependientes de canales de Ca^{+2} del

tipo L. También son procesos pendientes: la estandarización de los parámetros de CM que lleven a una diferenciación óptima (morfológica y bioquímica) de las células cromafines hacia un fenotipo neuronal, para su posterior utilización en posibles terapias contra enfermedades neurodegenerativas; así como la explicación de si la distribución de las células cromafines, en el plato de cultivo, es debido a corrientes eléctricas inducidas en el medio, al igual que la búsqueda de contenido ferromagnético dentro de las células cromafines.

7. BIBLIOGRAFIA

Belyaev I.Y., Alipov E.D. (2001). Frequency-Dependent Effects of ELF Magnetic Field on Chromatin Conformation in *Escherichia coli* Cells and Human Lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1526**: 269-276.

Binhi V.N. (1997). Interference of Ion Quantum States within a Protein Explains Weak Magnetic Field's Effect on Biosystems. *Electro- and Magnetobiology* **16 (3)**: 203-214.

Blackman C.F., Benane S.G., House D.E. (1993). Evidence for Direct Effect of Magnetic Fields on Neurite Outgrowth. *The FASEB Journal* **7**: 801-806.

Blackman C.F., Blanchard J.P., Benane S.G., House D.E. (1996). Effect of AC and DC Magnetic Field Orientation on Nerve Cells. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **220**: 807-81.

Blackman C.F., Blanchard J.P., Benane S.G., House D.E., Elder J.A. (1998). Double Blind Test of Magnetic Field. Effects on Neurite Outgrowth. *Bioelectromagnetics* **19**:204-209.

Craviso G.L., Chatterjee I., Publicover N.G. (2003). Catecholamine Release from Cultured Bovine Adrenal Medullary Chromaffin Cells in the Presence of 60-Hz Magnetic Fields. *Bioelectrochemistry* **59**: 57-64.

Drucker-Colín R., Verdugo-Díaz L., Méndez M., Carrillo-Ruíz J., Morgado-Valle C., Hernández-Cruz A., Corkidi G. (1994). Comparison between Low Frequency Magnetic Field Stimulation and Nerve Growth Factor Treatment of Cultured Chromaffin Cells, on Neurite Growth, Noradrenaline Release, Excitable Properties, and Grafting in Nigrostriatal Lesioned Rats. *Molecular and Cellular Neurosciences* **5**: 485-498.

Drucker-Colín R., Verdugo-Díaz L., Morgado-Valle C., Solís-Maldonado G., Ondarza R., Boll C., Miranda G., Wang G.J., Volkow N. (1999). Transplant of Cultured Neuron-Like Differentiated Chromaffin Cells in a Parkinson's Disease Patient. A Preliminary Report. *Archives of Medical Research* **30**: 33-39.

Feria-Velasco A., Castillo-Medina S., Verdugo-Díaz L., Castellanos E., Orozco-Suarez S., Sánchez-Gómez C., Drucker-Colín R. (1998). Neuronal Differentiation of Chromaffin Cells In Vitro, Induced by Extremely Low Frequency Magnetic Fields or Nerve Growth Factor: A Histological and Ultrastructural Comparative Study. *Journal of Neuroscience Research* **53**: 569-582.

Funk H.W.R., Monsees T.K. (2006). Effects of Electromagnetic Fields on Cells: Physiological and Therapeutical Approaches and Molecular Mechanisms of Interaction. *Cells Tissues Organs* **182**: 59-78.

Ganong F.G. Fisiología Médica. México. El Manual Moderno 16ª edición (1998) Tr. Por Dieter Mascher. p.p 401-404.

Ikehara T., Park K.H., Houchi H., Yamaguchi H., Hosokawa K., Shono M., Minakuchi K., Tamaki T., Kinouchi Y., Yoshizaki K., Miyamoto H. (1998). Effects of a Time-Varying Strong Magnetic Field on Transient Increase in Cytosolic Free Ca^{+2} Induced by Bradykinin in Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells. *FEBS Letters* **435**: 229-232.

Johnson M.S., Bazylynsky D.A., Frankel R.B. (1997). Magneto-Aerotaxis in Marine Coccoid Bacteria. *Biophysical Journal* **73**: 994-1000.

Kalcheim C., Langley K., Unsicker K. (2002). From the Neural Crest to Chromaffin Cell Development. Introduction to a Session on Chromaffin Cell Development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971**: 544-546.

Kheifets L., Shimkada R. (2005). Childhood Leukemia and EMF: Review of the Epidemiologic Evidence. *Bioelectromagnetics Supplement* **7**: S51-S59.

Lacy-Hulbert, A., Metcalfe J.C., Hesketh R. (1998). Biological Responses to Electromagnetic Fields. *The FASEB Journal* **12**: 395-420.

Lahijani M.S., Ghafoori M. (2000). Teratogenic Effects of Sinusoidal Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on Morphology of 24 hr Chick Embryos. *Indian J. Exp. Biol.* **38(7)**:692-9.

Lednev V.V. (1991). Possible Mechanism for the Influence of Weak Magnetic Fields on Biological Systems. *Bioelectromagnetics* **12(2)**:71–75.

Litovitz T.A., Montrose C.J., Wang W. (1992). Dose-Response Implications of the Transient Nature of Electro Magnetic Fields- Induced Bioeffects: Theoretical Hypotheses and Predictions. *Bioelectromagnetics* **13 S1**: 237-246.

Madrazo I., Drucker-Colín R., Díaz V. (1987). Open Microsurgical Autograft of Adrenal Medulla to the Right Caudate Nucleus in Two Patients with Intractable Parkinson's Disease. *New. Engl. J. Med.* **316**: 831-834.

Morgado-Valle C., Verdugo-Díaz L., García D.E., Morales-Orozco C., Drucker-Colín R. (1998). The Role of Voltage-Gated Ca^{+2} Channels in Neurite Growth of Cultured Chromaffin Cells Induced by Extremely Low Frequency (ELF) Magnetic Field Stimulation. *Cell Tissue Research* **291**: 217-230.

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

Ohtsu S., Miyakoshi J., Tsukada T., Hiraoka M., Abe M., Takebe H. (1995). Enhancement of β -Galactosidase Gene Expression in Rat Pheocromocytoma Cells by Exposure to Extremely Low Frequency Magnetic Fields. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212 (1)**: 104-109.

Olivares-Bañuelos T., Navarro L., González A., Drucker-Colín R. (2004). Differentiation of Chromaffin Cells Elicited by ELF MF Modifies Gene Expression Pattern. *Cell Biology International* **28**: 273-279.

Portaccio M., De Luca P., Durante D., Grano V., Rossi S., Bencivenga U., Lepore M., Mita D.G. (2005). Modulation of the Catalytic Activity of Free and Immobilized Peroxidase by Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields: Dependence on Frequency. *Bioelectromagnetics* **26 (2)**: 145-152.

Shah J.P., Midkiff P., Brandt P.C., Siskin B.F. (2001). Growth and Differentiation of PC6 Cells: the Effects of Pulsed Electromagnetic Fields (PEMF). *Bioelectromagnetics* **22**:267-271.

Schimmelpfeng J., Weibezahn K.F., Dertinger H. (2005). Neuronal Outgrowth of PC-12 Cells After Combined Treatment With Nerve Growth Factor and a Magnetic Field: Influence of the Induced Electric Field Strength. *Bioelectromagnetics* **26**:74-77.

Tagüeña J. y Martina E. De la Brújula al Espín. El Magnetismo. México. Fondo de Cultura Económica. 2ª Edición (1998).

Tischler A. S. (2002). Chromaffin Cells as Models of Endocrine Cells and Neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **971**: 366-370.

Unsicker K., Krisch B., Otten U., Thoenen H. (1978). Nerve Growth Factor Induced Fiber Outgrowth from Isolated Rat Adrenal Chromaffin Cells: Impairment by Glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3498-3502.

Unsicker K., Skaper S.D., Varon S. (1985). Neurotrophic and Neurite-Promoting Factors: Effects on Early Postnatal Chromaffin Cells from Rat Adrenal Medulla. *Dev. Brain Res.* **17**: 117-129.

Verdugo-Díaz L., Palomero-Rivero M., Drucker-Colín R. (1998). Differentiation of Chromaffin Cells by Extremely Low Frequency Magnetic Fields Changes Ratios of Catecholamine Type Messenger. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **46**: 297-300.

Zhadin, M. M. (2001). Review of Russian Literature on Biological Action of DC and Low-Frequency AC Magnetic Fields. *Bioelectromagnetics* **22**: 27-45.

Zhadin M.N., Novikov V.V., Barnes S.F., Pergola N.F. (1998). Combined Action of Static and Alternating Magnetic Fields on Ionic Current in Aqueous Glutamic Acid Solution. *Bioelectromagnetics* **19**:41-45.

Zhang L., Zhou L., Vega-González A., Mendoza D., Drucker-Colín R. (1997). Extreme Low Frequency Promote Neurite Varicosity Formation and Cell Excitability in Cultured Rat Chromaffin Cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **Nov 118 (3)**: 295-299.