

03062
6
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

**PROYECTO DE POSTGRADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
ÁREA: NEUROCIENCIAS**

**ESTUDIOS SOBRE LOS POSIBLES MECANISMOS
DE NEUROGENIZACIÓN DE LAS CÉLULAS
CROMAFINES INDUCIDAS POR CAMPOS
MAGNÉTICOS DE BAJA FRECUENCIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA LA
B I Ó L Ó G A
CONSUELO MORGADO VALLE**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ RAÚL DRUCKER COLÍN
COTUTOR: DRA. LETICIA VERDUGO DÍAZ**

MEXICO, D.F.

OCTUBRE DE 1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Agradezco a los miembros del jurado sus comentarios que enriquecieron de manera significativa este trabajo.

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Dr. Arturo Hernández Cruz

Dr. Oscar Próspero García

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dr. René Drucker Colín

Este trabajo fue realizado con el apoyo de CONACyT, por medio de la beca de maestría con número de registro 90765.

RESUMEN

Las células cromafines de rata neonata adquieren un fenotipo neuronal cuando son estimuladas durante siete días con campos magnéticos (CM) de 7 G de intensidad y 60 Hz de frecuencia. Esta neurogenización es similar a la observada en las células tratadas con factor de crecimiento nervioso (NGF). En este trabajo, se investigó mediante técnicas farmacológicas si los canales de calcio sensibles a voltaje se encuentran involucrados en el mecanismo de neurogenización mediada CM. Se realizaron cultivos de células cromafines de ratas de 1-3 días de nacidas. Las células se mantuvieron en cultivo durante siete días en presencia de NGF, CM o sin tratamiento (C). Se aplicaron de manera crónica (desde el segundo día de cultivo) bloqueadores orgánicos de canales de calcio y el agonista de los canales de calcio tipo L, Bay K8644. Después de una inmunotinción con anticuerpo anti-tirosina hidroxilasa, se cuantificó el porcentaje de neurogenización, obtenido por conteo en el microscopio del número de células neurogenizadas respecto al número total de células. Además, se midió la longitud de las neuritas en cada condición, mediante el uso de un digitalizador de imágenes. Con el fin de observar si las células se mantuvieron funcionales después del tratamiento con NGF, se realizaron experimentos de liberación de ³H-noradrenalina. Los resultados indicaron que el NGF y el CM producen un porcentaje similar de neurogenización (35%). El bloqueo de los canales de calcio tipo L con nifedipina (0.1 o 0.3 μ M) disminuyó de manera significativa la neurogenización de las células estimuladas con CM, sin tener ningún efecto en las células tratadas con NGF. El bloqueador de canales de calcio tipo N, ω -conotoxina (0.5 o 1 μ M) no produjo ningún efecto significativo en la neurogenización mediada por NGF o CM. El agonista de canales tipo L, Bay K8644, produjo un incremento en el porcentaje de neurogenización en las células cultivadas en presencia de NGF o CM. La longitud de las neuritas disminuyó significativamente cuando las células cultivadas con NGF o CM fueron tratadas con nifedipina y/o ω -conotoxina. No se encontraron diferencias significativas en el patrón de liberación de ³H-noradrenalina inducida por KCl, entre los diferentes grupos. La presencia de nifedipina de manera aguda durante el pulso despolarizante de KCl, inhibió de manera significativa la liberación de ³H-noradrenalina sólo en algunos grupos.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
I. Sistemas de señalización celular.....	1
II. Factores de crecimiento.....	5
Familias de factores de crecimiento	
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	
Relación NGF-Ca ²⁺	
III. Campos magnéticos.....	11
Antecedentes históricos	
Definición y propiedades de un campo magnético	
Fuerza magnética sobre un conductor que lleva una corriente eléctrica	
Ley de Biot-Savart: campo magnético producido por un alambre que lleva corriente	
Fuerza magnética entre dos conductores paralelos	
El campo magnético de un solenoide	
IV. Campos magnéticos y sistemas biológicos.....	19
Frecuencia	
Intensidad	
Respuestas celulares a los campos magnéticos	
Células endocrinas	
Linfocitos	
Neuronas	
Líneas celulares	
Estudios <i>in vivo</i>	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
OBJETIVOS.....	25
Generales	
Específicos	
HIPOTESIS.....	25
MÉTODOS.....	26
Cultivo de células cromafines	
Exposición de las células cromafines al campo magnético	
Inmunocitoquímica	
Cuantificación de la neurogenización	
Análisis morfométricos	
Liberación de 'H-noradrenalina	
Análisis estadísticos	
RESULTADOS.....	28
Inmunocitoquímica y morfología de las células cromafines en cultivo	
Diferenciación de las células cromafines con nifedipina y ω -conotoxina	
Diferenciación de las células cromafines con Bay K8644	
Análisis de la longitud de las neuritas	
Porcentaje de neurogenización en presencia de bajo Ca ²⁺ extracelular	
Liberación de 'H-noradrenalina	
DISCUSION.....	36
REFERENCIAS.....	42

INTRODUCCION

Todos los sistemas biológicos están sujetos constantemente a diversos tipos de influencias químicas, abarcando desde hormonas y factores de crecimiento, hasta toxinas. Estas sustancias pueden ser producidas por la célula misma o recibidas del entorno. Los mecanismos a través de los cuales actúan estas sustancias son múltiples y con frecuencia no se conocen del todo. Sin embargo, todos estos estímulos comparten un factor común: la interacción con un receptor.

Recientemente, el estudio de estímulos físicos y sus efectos en los sistemas biológicos ha cobrado especial importancia. Entre ellos, la estimulación electromagnética ha sido ampliamente estudiada, debido a las diversas respuestas biológicas que es capaz de producir. La principal diferencia entre los estímulos químicos y los físicos, es que la estimulación física no ejerce sus acciones sobre receptores específicos.

I. SISTEMAS DE SEÑALIZACION CELULAR

En una célula existen proteínas especializadas llamadas receptores, las cuales se encuentran localizadas en la membrana celular o en el citoplasma, dependiendo la naturaleza de su ligando. Estos receptores son capaces de unir con alta afinidad moléculas como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, etc.

Cuando se trata de un receptor membranal, la unión de su ligando puede tener dos efectos: la entrada de iones a la célula, o la activación de sistemas específicos de transducción de señales. En el primer caso se dice que se trata de un receptor ionotrópico y en el segundo, de uno metabotrópico.

En el caso específico de los receptores metabotrópicos, la formación del complejo ligando-receptor desencadena dentro de la célula una serie de reacciones que en conjunto se denominan cascadas de segundos mensajeros. Estos receptores pueden ser clasificados en dos grandes categorías:

1. Receptores acoplados a proteínas G: estos receptores se encuentran acoplados a una proteína que une GTP para activarse. Las proteínas G, a su vez pueden activar o desactivar a enzimas efectoras como a) la adenilato ciclasa que transforma el ATP a AMP cíclico (AMPc); o b) la fosfolípasa C (PLC).

a) Adenilato ciclasa

El resultado final de la actividad de esta enzima es la formación de AMPc y, por consiguiente un aumento en su concentración intracelular. Los niveles intracelulares de AMPc son regulados por una fosfodiesterasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina.

El AMPc activa a una proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), capaz de fosforilar en serinas y treoninas a otras proteínas. Esta PKA consta de dos subunidades reguladoras y dos catalíticas responsables de la fosforilación. La unión de dos moléculas de AMPc a cada una de las subunidades reguladoras induce la disociación del complejo y las subunidades catalíticas quedan activadas.

b) PLC

La PLC es una fosfodiesterasa específica que hidroliza fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) a diacilglicerol (DAG) que permanece en la membrana, e inositol 1,4,5- trifosfato (IP₃) que difunde al citoplasma.

DAG: El aumento de DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), la cual también es dependiente de calcio. Esta cinasa ha sido implicada en procesos como la modulación de canales iónicos, la expresión génica y la proliferación celular, entre otros.

IP₃: El retículo endoplásmico posee receptores específicos a este segundo mensajero. Al unirse el IP₃ estos receptores, promueve la movilización del Ca^{2+} almacenado en este organelo.

2. Receptores con actividad catalítica intrínseca: en este caso los receptores poseen actividad de tirosina cinasa. Además de ser capaces de autofosforilarse en restos de tirosina específicos, pueden fosforilar, también en tirosinas a otras proteínas.

PAPEL DEL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO

La evidencia experimental sitúa al Ca^{2+} como un mediador de muchas respuestas celulares. La relevancia de las concentraciones intracelulares de este ión es tal, que las células han desarrollado mecanismos para mantener la concentración citoplasmática constante.

La concentración extracelular de Ca^{2+} es aproximadamente 10^{-1} M, mientras que la intracelular es 10^{-7} M. Para mantener constante la concentración citoplasmática de Ca^{2+} , la célula lo expulsa hacia el espacio extracelular y lo almacena en el retículo endoplásmico. Cuando el Ca^{2+} citoplásmico alcanza niveles tóxicos para la célula (10^{-6}), las mitocondrias son capaces de captarlo, por medio de una Ca^{2+} -ATPasa de baja afinidad y alta capacidad.

Este control tan estricto de las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} , permite a la célula interpretar pequeños cambios como señales reguladoras. Muchos mensajeros químicos, como hormonas y neurotransmisores, promueven la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular o su salida de las pozas intracelulares.

Las células excitables poseen canales dependientes de voltaje que se abren durante la despolarización membranar y permiten la entrada de Ca^{2+} . En otras células, la entrada de Ca^{2+} se facilita tras la activación de canales operados por receptores acoplados a proteínas G.

El aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} provoca la preactivación de la PKC, una proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos (DAG) que es mediadora de algunos procesos celulares.

Otra proteína importante a la que se une el Ca^{2+} es la calmodulina. El complejo Ca^{2+} -calmodulina regula directa o indirectamente a algunas enzimas.

CLASIFICACION FUNCIONAL DE LOS CANALES DE CALCIO

	Canal T/R ? bajo	Canal L alto	Canal N alto	Canal P/Q? alto
Umbral de activación				
Desactivación (cierres)	lento	rápido	rápido	rápido
Inactivación	rápida (completa en unos 50 ms)	no completa en menos de 300-500 ms	menos lenta	muy lenta
Conductancia unitaria (con 100 mM Ba^{2+})	8 pS	\approx 20 pS	-	-
Farmacología	resistente a dihidropiridinas bloqueo por amiloride y octanol bloqueo por Ni^{2+} , más efectivo que Cd^{2+}	inhibido por dihidropiridinas	inhibido por ω -conotoxina (fracción GVIA) resistente a dihidropiridinas	inhibido por ω -agatoxina (fracción IV A) resistente a dihidropiridinas

DISTRIBUCION TISULAR

Canal T: En tejidos excitables (neuronas, músculo liso y cardiaco y células endocrinas) y algunas células no excitables. En células cromafines, glómicas y en neuronas de los ganglios simpáticos no existen.

Canal L: En casi todos los tejidos excitables (neuronas, músculo liso y cardiaco y células endocrinas) y algunas células no excitables. En músculo esquelético existe un subtipo con una cinética de activación extraordinariamente lenta.

Canal N: Casi exclusivamente en neuronas centrales y periféricas. Algunas neuronas (como por ejemplo las células de Purkinje) son particularmente pobres en estos canales de Ca^{2+} .

Canal P/Q: Neuronas (particularmente en células de Purkinje del cerebelo) y en ganglio estrellado del calamar.

REGULACION DE LOS CANALES DE CALCIO

La regulación de los canales de calcio puede ser positiva (aumento de la corriente) o negativa (disminución de la corriente). Se ha descrito modulación positiva tanto en fibras musculares cardíacas como en el músculo esquelético y músculo liso, y modulación negativa en neuronas. Tanto en la regulación positiva como negativa de los canales de calcio el mecanismo general de acción suele ser: unión del neurotransmisor a su receptor en la membrana plasmática, activación de una proteína G que a su vez modifica la actividad de otras enzimas de membrana (por ejemplo, adenilato ciclasa, fosfolipasa C, etc), modificación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos u otros segundos mensajeros como el Ca^{2+} , y aumento o disminución de la actividad de proteínas cinasas o de fosfatasa. Los canales de calcio en una misma célula pueden estar modulados de forma opuesta por dos neurotransmisores: por ejemplo, en células cardíacas los agonistas β -adrenérgicos (a través de un incremento en los niveles de AMPc) aumentan la corriente de calcio (I_{Ca}), mientras que la acetilcolina disminuye la I_{Ca} . Por otra parte, la acción de un mismo neurotransmisor puede estar mediada a través de más de una vía como, por ejemplo los agonistas α -adrenérgicos cuando se unen a sus receptores α_2 pueden disminuir la actividad de la adenilato ciclasa pero también, aunque con menor efecto, estimular la hidrólisis del fosfatidilinositol.

Los mediadores intracelulares hasta ahora descritos en la modulación de los canales de calcio son:

Proteína cinasa A: distintos neurotransmisores al unirse a su receptor, activan una proteína G, que a su vez regula la actividad de la adenilato ciclasa quien cataliza la síntesis de AMPc. La activación de la proteína cinasa A da lugar a la fosforilación de canales de calcio de alto umbral en neuronas de vertebrados e invertebrados, así como en fibras musculares cardíacas y esqueléticas. En fibras procedentes del músculo liso parece no tener efecto. Dependiendo del tipo de proteína G acoplada al receptor de membrana la actividad de la adenilato ciclasa puede regularse positivamente mediante la acción de una proteína G estimuladora (G_s), o negativamente mediante la activación de una proteína G inhibidora (G_i o G_o). En la molécula del canal, los residuos donde se produce la fosforilación parecen estar en la subunidad α_1 , aunque la subunidad β parece facilitar que especialmente estos sitios sean accesibles a la proteína cinasa.

Proteína cinasa C (PKC): esta enzima, muy abundante en neuronas, cataliza la fosforilación de residuos de treonina y serina en presencia de Ca^{2+} , diacilglicerol y fosfolípidos. El efecto de esta enzima sobre los canales de calcio varía según el tipo celular. Se ha demostrado *in vitro* que la PKC produce fosforilación del receptor de dihidropiridina purificado procedente del músculo esquelético. En neuronas de *Aplysia*, fotorreceptores de *Hermisenda* y neuronas de hipocampo la activación de la PKC produce un incremento de la I_{Ca} , mientras que en neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, del núcleo dorsal del rafe y en los ganglios de *Helix aspersa* la enzima produce un efecto opuesto. Por otro lado en miocitos procedentes del ventrículo de rata la I_{Ca} primero aumenta en presencia de TPA (12-O-tetradecanolphorbol-13-acetato, un activador de la PKC) pero luego se produce una gran inhibición de la misma. La latencia de la modulación positiva de la I_{Ca} en miocitos cardíacos por PKC parece también depender del potencial de membrana.

Acción directa de la proteína G: la subunidad α de la proteína G_s aumenta la actividad de los canales de calcio del músculo esquelético y corazón a través de una acción directa, ya sea sobre los propios canales o sobre una proteína íntimamente asociada a éstos. El mecanismo de acción no se conoce aún.

Proteína cinasa dependiente de GMPC: La activación de esta enzima puede dar lugar a un aumento o a una disminución de la I_{Ca} . En neuronas de caracol, aumenta directamente la I_{Ca} y potencia el incremento de la corriente de calcio producido por serotonina. Por el contrario, en fibras musculares cardíacas disminuye la I_{Ca} previamente potenciada por agonistas β -adrenérgicos; este último efecto parece deberse a un incremento en la hidrólisis de AMPc por la actividad de una fosfodiesterasa dependiente de GMPC.

IP₃: Este metabolito, producto de la hidrólisis del fosfatidilinositol, aumenta la actividad de los canales de los túbulos T. El IP₃ también es capaz de afectar otros canales de calcio como los del retículo sarcoplásmico y los canales de calcio no dependientes de voltaje de la membrana plasmática en algunas células.

Como ya se mencionó, el Ca^{2+} juega un papel importante en eventos celulares como el crecimiento neurítico, la liberación de neurotransmisores, las respuestas eléctricas, la supervivencia, la activación génica y muerte celular. Este ion actúa en la regulación de canales iónicos, fosfolipasas, cinasas y proteasas, y en combinación con la calmodulina puede regular a la ATPasa de Ca^{2+} , a la adenilato ciclasa, y a la óxido nítrico (NO) sintetasa. Prácticamente todos los sistemas de transducción de señales requieren en algún punto a este ion ejerciendo alguna función de regulación.

II. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son un conjunto de polipéptidos, aislados de diversos tejidos, que tienen la capacidad de estimular o inhibir la división celular, y de estimular el crecimiento y la diferenciación. Estos factores ejercen sus efectos a través de la unión a un receptor específico de la membrana celular, lo que desencadena un proceso de transducción de señales intracelular, que culmina a nivel nuclear con la expresión de una serie de genes que promoverán el aumento o inhibición de la mitosis o de la diferenciación.

Además de sus efectos sobre la mitosis y la diferenciación, actualmente se sabe que los factores tróficos pueden regular la secreción, la supervivencia, la movilidad y la expresión de determinadas características fenotípicas de las células diana.

La síntesis de los diversos factores tróficos no está restringida a un tejido específico, sino que puede ocurrir en un gran número de tejidos. Generalmente ejercen sus efectos a través de mecanismos autocrinos o paracrinos. Sin embargo, las acciones biológicas de un factor sobre su célula blanco pueden ser moduladas por otros factores de crecimiento, por lo que es de esperar que en un mismo tejido se produzcan un gran número de ellos.

Se ha intentado agrupar en familias a los diversos factores de crecimiento existentes en base a las homologías estructurales encontradas entre sus genes.

FAMILIAS DE FACTORES DE CRECIMIENTO

FAMILIA

EGF

(Factor de crecimiento epidérmico)

TGF β

(Factor de crecimiento transformante)

FGF

(Factor de crecimiento fibroblástico)

PDGF

(Factor de crecimiento derivado de plaquetas)

IGF

(Factor de crecimiento parecido a insulina)

NGF

(Factor de crecimiento nervioso)

MIEMBROS

EGF

TGF α

TGF $\beta_{1,2}$

Sustancia inhibidora Mulleriana
Proteína morfogénica del huso

FGF a

FGF b

ECDG (Factor de crecimiento derivado de carcinoma embrionario)

PDGF-AA

PDGF-AB

PDGF-BB

IGF-1

IGF-2

NGF

BDNF (Factor de crecimiento derivado del cerebro)

NT (Neurotrofinas)

Modificado de Tresguerres, 1992.

Factor de crecimiento nervioso (NGF)

Este factor de crecimiento fué el primero en ser aislado. Fué descubierto en 1951, cuando Levi-Montalcini y Hamburger observaron que un factor difusible secretado por un sarcoma de ratón, implantado en embriones de pollo, producía el crecimiento de neuritas de las neuronas de los ganglios simpáticos y sensoriales. Cohen en 1960 purificó el NGF de la glándula submaxilar de ratón y demostró que ese factor era una proteína. Trabajos posteriores determinaron que se trataba de un complejo de tres subunidades, de las cuales solo una tenía efectos en las neuronas. La subunidad activa tiene un peso molecular de aproximadamente 26 kD y se compone de dos cadenas idénticas de 118 aminoácidos unidas por enlaces no covalentes (Revisión en Greene y Shooter, 1980; Levi-Montalcini, 1987).

El NGF tiene efectos altamente específicos sobre subpoblaciones neuronales definidas, entre ellas las neuronas simpáticas, las neuronas sensoriales primarias, las neuronas colinérgicas septales y las interneuronas estriadas colinérgicas. En estas células, el NGF evita la muerte neuronal y modula la síntesis de neurotransmisores y la morfología neuronal.

A través de más de cuarenta años de experimentación se ha observado que los efectos del NGF sobre las células nerviosas son variados, incluyendo la inducción de enzimas de síntesis de neurotransmisores, el incremento de la síntesis de neuropéptidos en neuronas sensoriales y la potenciación de la sobrevida. Estimula además la formación, ramificación y alargamiento de neuritas, la síntesis de neurofilamentos y actúa como atrayente quimiotáctico en los conos de crecimiento de las neuronas sensoriales.

Al parecer todas las neuronas sensoriales derivadas de la cresta neural requieren NGF para sobrevivir durante el desarrollo embrionario y el período postnatal temprano. En edad adulta, los factores tróficos actúan crónicamente para mantener las funciones neuronales normales (Snider y cols, 1989).

El NGF parece tener un efecto modesto en la síntesis de tubulina, sin embargo incrementa de manera significativa la síntesis de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs), incluyendo la tau y la MAP2, que son abundantes durante el desarrollo del sistema nervioso central. También promueve la fosforilación de estas proteínas lo que aumenta sus interacciones con los microtúbulos (Fisher y cols, 1991).

En las neuronas simpáticas, el NGF induce la síntesis de tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas. (Paravicini y cols, 1975). Además se ha demostrado que la médula adrenal produce y secreta NGF en cultivo (Harper y cols, 1976). En 1978, Unsicker y colaboradores observaron que el NGF produce el crecimiento de fibras en las células cromafines aisladas. Este crecimiento desaparece con concentraciones de glucocorticoides equivalentes a las circulantes en sangre en la glándula adrenal. En las células cromafines aisladas y cultivadas con NGF se ha observado el incremento en la actividad de la tirosina hidroxilasa (Seidl, 1987).

Existen dos tipos de receptores para el NGF, uno de baja afinidad llamado $p75^{NGFR}$ y uno de alta afinidad, perteneciente a la familia de receptores trk (tirosina cinasa). El receptor de alta afinidad es el producto de expresión del proto-oncogen $p140^{trkA}$ y se ha denominado como $trkA$ (Johnson y cols, 1986; Michael y Priestley, 1996) Alrededor de un 10-15% de los receptores de NGF presentes en una célula diana son de alta afinidad ($K_d = 10^{11}$) y el resto son de baja afinidad ($K_d = 10^6$) (Sutter y cols, 1979; Landreth y Shooter, 1980). Pese a la menor presencia de receptores de alta afinidad, la respuesta biológica es dependiente de la activación de estos (Sonnenfeld e Ishii, 1985).

En la línea celular de feocromocitoma PC12 (células cromafines neoplásicas), el NGF promueve la diferenciación hacia un fenotipo de neuronas simpáticas (Greene y Tischler, 1976). Varios días después de la exposición de las células PC12 al NGF, se llevan a cabo fenómenos mediados por transcripción, incluyendo la extensión de neuritas, el cese de la mitosis y la adquisición de un fenotipo neuronal caracterizado por el desarrollo de excitabilidad eléctrica y biosíntesis de neurotransmisores. Para iniciar este programa de diferenciación, el NGF interactúa con sus dos receptores identificados, el $trkA$ y el $p75^{NGFR}$ (Johnson y cols, 1986). La actividad de cinasa de tirosinas del receptor $trkA$ es inducida después de la unión del NGF en las células PC12. Se piensa que la cinasa de tirosina del receptor trk , una vez activada por su ligando inicia una cascada de señales que incluye la fosforilación en tirosinas de varias proteínas celulares como la fosfolipasa $Cy1$ y la $IP3$ cinasa. Otros fenómenos inducidos por el NGF son la activación de numerosas proteínas cinasas, incluyendo serina/treonina cinasas como la MAP cinasa, la cinasa $S6$ y la PKC ; así como la activación de genes como c -fos, $NGFIA$ y el $NGFIB$. En las células PC12 el crecimiento de neuritas es iniciado después de 24 a 48 horas de exposición al NGF y la adquisición del fenotipo neuronal ocurre después de 3 a 4 días (Greene y Tischler, 1976)

También se ha observado que el NGF regula las corrientes de sodio de los diferentes tipos de canales en células PC12 (Dichter y cols, 1977; Ifune y Steinbach, 1990), en neuronas sensoriales (Aguayo y White, 1992) y en células cromafines (Islas-Suárez y cols, 1994).

Se sabe que las neuronas simpáticas en desarrollo y las neuronas sensoriales, ambas derivadas de la cresta neural, requieren NGF para sobrevivir tanto *in vivo* como *in vitro*. Koike y Tanaka (1991) propusieron que las concentraciones de Ca^{2+} citoplásmico libre determinan la dependencia por este factor trófico. En ausencia del NGF las neuronas simpáticas no requieren elevación del calcio intracelular para sobrevivir en presencia de alto K^+ o AMPc, pero la actividad del canal de calcio sensible a dihidropiridinas es esencial para la sobrevida (Murell y Tolkovsky, 1993). En este tipo neuronal, el influxo de calcio extracelular es necesario para el crecimiento de neuritas, proceso susceptible de inhibición mediante bloqueadores de canales de calcio, tanto inorgánicos (Cd^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+}), como orgánicos (nifedipina). Así pues, Rogers y Hendry (1990) establecieron que una concentración de 0.1 μM de nifedipina es capaz de afectar de manera significativa el crecimiento neurítico, sin afectar la sobrevida.

En neuronas ganglionares, el NGF induce liberación de calcio intracelular de manera independiente a las concentraciones de calcio extracelular lo que sugiere movimiento de las pozas intracelulares de calcio. (Yamashita y Kawana, 1991).

En células cromafines y PC12, el NGF induce cambios tanto a nivel enzimático como morfológico (Acheson y cols, 1984; Müller y Unsicker, 1986; Otten y cols, 1977; Unsicker y cols, 1978; Ogawa y cols, 1984), y en las células cromafines el NGF es un mitógeno (Lillien y Claude, 1985; Tischler y cols, 1993) El tratamiento con NGF de las células PC12 también parece regular la expresión de los diferentes tipos farmacológicos de los canales de calcio (Streit y Lux, 1989). Las células PC12 (células cromafines neoplásicas) poseen canales de calcio sensibles a voltaje que se bloquean con dihidropiridinas (canales tipo L).

En experimentos de liberación de 3H -Noradrenalina en células PC12, la nicardipina (una dihidropiridina) ejerce una acción inhibitoria de la liberación, misma que disminuye gradualmente cuando las células son tratadas con NGF (Takahashi y cols, 1985). Esto sugiere que durante el proceso de diferenciación de las células PC12, los canales de calcio cambian a un tipo menos sensible a dihidropiridinas. El componente mayoritario de la corriente de Ca^{2+} en las células PC12 diferenciadas con NGF es insensible a dihidropiridinas, y un componente minoritario permanece sensible a ellas (Rausch y cols, 1990).

El mecanismo exacto mediante el cual actúa el NGF no se conoce, aunque se sabe que a través de su receptor con actividad de cinasa de tirosinas (trKA) activa numerosas proteínas cinasas (serina/treonina cinasas) e induce genes de proteínas de unión nuclear como c-fos. También produce un incremento en la expresión de canales de calcio (Usowicz y cols, 1990) y un incremento en la densidad de corriente de Ca^{2+} , especialmente del componente sensible a omega-conotoxina (Furukawa y cols, 1993) aunque este hecho es muy controvertido.

Con otros factores inductores de neurogenización tales como el anticuerpo contra Thy-1 (Doherty y cols, 1993), el oncogen ras o la cinasa de tirosinas src (Rausch y cols, 1990) se ha demostrado que los canales de calcio juegan un papel muy importante tanto en la sobrevida como en el crecimiento neurítico.

RELACION NGF- Ca^{2+}

El efecto del NGF sobre las corrientes de Ca^{2+} de las células diana es controvertido. Si bien es conocido que el NGF produce un aumento en las corrientes de Ca^{2+} , no se sabe hasta que punto este aumento es causa o consecuencia del proceso de neurogenización. Para resolver este problema se han empleado diversos tipos de abordajes entre los que destacan los farmacológicos (incluyendo el uso de isótopos radiactivos), los fluorométricos y los electrofisiológicos.

Al inicio de la década de 1980, cuando el conocimiento de los eventos desencadenados por el NGF eran mínimos, existían dos hipótesis con respecto al mecanismo de acción del NGF: una que sugería que el NGF provocaba cambios en los niveles de AMP cíclico y otra que proponía al Ca^{2+} como segundo mensajero.

En 1980 Landreth y cols, investigaron mediante la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ el efecto del NGF sobre los flujos membranales de Ca^{2+} . Ellos no encontraron ninguna alteración significativa de los flujos de Ca^{2+} en células PC12 provocada por el NGF.

Con el desarrollo de las técnicas fluorescentes Pandiella-Alonso y cols (1986), encontraron en células cromafines de bovino un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, el cual persiste por lo menos 10 minutos después de la aplicación aguda de NGF y es dependiente de Ca^{2+} extracelular.

Como podemos observar ambas evidencias son contradictorias ya que Pandiella-Alonso y cols, atribuyen un efecto agudo del NGF sobre el flujo de Ca^{2+} y Landreth no observa tal efecto.

A principios de esta década se retomó el estudio del efecto agudo del NGF, tanto por técnicas fluorométricas como con el uso de isótopos radioactivos. Nikodijevic y Guroff (1991) observaron un incremento en la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en las células PC12, al aplicar NGF. La captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ tuvo un pico máximo a los 5 minutos de tratamiento y 15 minutos después recuperó sus niveles basales. Es importante hacer notar que la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ fué inhibida por nifedipina y no por ω -conotoxina, lo que indica un influjo de Ca^{2+} a través de los canales tipo L y no N.

En 1993, Ichida y cols estudiaron la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ provocada por un pulso despolarizante de KCl, en células PC12 tratadas con NGF crónicamente. Estos autores observaron que el KCl produce un aumento en la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ el cual no es afectado por la presencia aguda o crónica de NGF. Este dato indica que en este tipo de experimentos donde se utiliza KCl, la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje es debida a la despolarización por KCl y no al tratamiento con NGF.

El entendimiento del efecto agudo del NGF sobre los flujos de Ca^{2+} , se complica cuando se introduce una nueva variable como responsable de la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Esta nueva variable es la posible liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares provocada por el tratamiento agudo con NGF. Contreras y Guroff (1987) observaron que el tratamiento agudo con NGF en células PC12 cargadas con ^3H -inositol provocó un incremento en la producción de inositol trifosfato, inositol bifosfato e inositol monofosfato. Este incremento fué detectable a los 15 minutos de tratamiento con NGF. En ausencia de Ca^{2+} extracelular la acumulación de fosfoinosítidos fue menor a la observada en presencia de Ca^{2+} extracelular. Este resultado sugiere que el tratamiento agudo con NGF estimula rápidamente la hidrólisis de fosfoinosítidos en células PC12 a través de un mecanismo dependiente de calcio extracelular. Este hecho podría tener fuertes implicaciones en el mecanismo de acción del NGF, abriendo la posibilidad de que el incremento en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} no sólo se deba a la entrada de Ca^{2+} sino también a la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico producida por la activación del receptor a IP_3 en este organelo.

Yamashita y Kawana (1991) observaron en neuronas ganglionares mediante fluorometría con Fura-2 que la infusión con NGF cerca de los cuerpos celulares provoca un incremento transitorio de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Este incremento se observó a los 25 minutos de tratamiento con NGF y tuvo una duración de 30 segundos. Sin embargo estos autores mencionan que el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es dependiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular, ya que la aplicación de NGF en células mantenidas en medio libre de Mg^{2+} y de Ca^{2+} y con 2 mM de EGTA, produce el mismo curso temporal del transitorio de Ca^{2+} .

Hasta este punto podemos decir que la mayor parte de la evidencia indica que el NGF tiene un efecto agudo en las células diana, aumentando las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Este incremento sin embargo, es transitorio y su dependencia de Ca^{2+} extracelular es discutida.

Rogers y Hendry (1990) en un trabajo farmacológico, intentaron esclarecer el papel del influjo de Ca^{2+} en la neurogenización de neuronas simpáticas. Estos autores emplearon bloqueadores orgánicos e inorgánicos de canales de Ca^{2+} con el fin de observar su efecto en la emisión y extensión de las neuritas. El crecimiento de las neuritas fue cuantificado después de 24 horas en cultivo usando microscopía de contraste de fase. Las observaciones de estos autores indican que los bloqueadores inorgánicos de canales de Ca^{2+} tienen un potente efecto en la inhibición de la neurogenización, con potencias relativas: $\text{Cd} > \text{Co} > \text{Ni} > \text{Mn} >$. Sin embargo, los autores no discuten el efecto de estos bloqueadores inespecíficos en la sobrevida de las neuronas. El uso de bloqueadores orgánicos de canales de Ca^{2+} tipo L como diltiazem y nifedipina produjo una inhibición significativa de la neurogenización de las neuronas simpáticas después de 24 horas de tratamiento con NGF, sin afectar de manera significativa la sobrevida. Estos experimentos son una evidencia a favor de la dependencia de Ca^{2+} extracelular para que el NGF ejerza sus efectos. Sin embargo, con estos

resultados no se puede establecer si esta dependencia existe sólo durante la fase temprana del efecto del NGF o si se prolonga a la fase tardía.

Para explicar sus hallazgos con respecto a los canales de Ca^{2+} tipo L, Rogers y Hendry sugieren dos posibles mecanismos: a) que una gran proporción del flujo de Ca^{2+} que se observa en la neurogenización mediada por NGF, ocurra a través de canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas que normalmente están activos en las neuronas simpáticas, o b) que el NGF produzca efectos intracelulares y/o membranales, tales como una despolarización parcial que favorezca el funcionamiento de los canales de calcio sensibles a dihidropiridinas.

Para probar la hipótesis de que la alteración de las corrientes de calcio pudieran estar involucradas en la activación de la neurogenización, Streit y Lux (1987) realizaron mediciones electrofisiológicas de las corrientes de Ca^{2+} en células PC12 tratadas con NGF. Al aplicar NGF directamente sobre las células, no encontraron ningún efecto en las corrientes en un período máximo de 40 minutos.

En otro tipo de experimentos, los autores aplicaron NGF en el cuarto día posterior a la resiembra y observaron que, si bien las corrientes aumentaban durante estos 4 días en ausencia de NGF, permanecían iguales durante los dos primeros días de tratamiento con NGF. Sin embargo la amplitud de la corriente de las células tratadas con NGF continuó aumentando durante el tratamiento con NGF, teniendo un máximo a los 12 días después de la resiembra, es decir a los ocho días de tratamiento con NGF.

Con el fin de establecer una relación entre el crecimiento de la célula tratada con NGF y su corriente de Ca^{2+} , los autores midieron los diámetros de las células así como el número de procesos mayores de 10 μm . Los resultados mostraron que tanto el área somática, como el número de neuritas aumentaron significativamente sólo en los dos primeros días de tratamiento con NGF. Sin embargo, durante este período no se observaron diferencias en la amplitud de la corriente, en el curso temporal ni en la relación corriente-voltaje.

Con estos experimentos los autores concluyen que si bien el crecimiento de las neuritas provocado por el NGF comienza dentro del primer día de tratamiento, las corrientes de Ca^{2+} no se afectan durante los dos primeros días de tratamiento con NGF. Además demuestran que la aplicación directa del NGF sobre las células no afecta las corrientes de Ca^{2+} , lo cual es una evidencia en contra de la hipótesis de que el NGF produce un flujo de Ca^{2+} para inducir la neurogenización de las células PC12. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Landreth y cols (1980), quienes no encuentran cambios en la captura de Ca^{2+} en las células tratadas con NGF.

Una segunda conclusión de este trabajo es que el número de canales de Ca^{2+} parece no aumentar simultáneamente con el crecimiento celular.

En un trabajo posterior (Streit y Lux, 1989) estos autores comparan la densidad de las corrientes de calcio en el soma, las neuritas y los conos de crecimiento de las células PC12 tratadas con NGF. Los resultados indicaron que los conos de crecimiento poseen la mayor cantidad de canales de Ca^{2+} , mientras que muy pocos canales se encuentran presentes en las neuritas. Esta mayor concentración de canales de Ca^{2+} en la punta de las neuritas en crecimiento de las células PC12, sugiere un posible papel de estos canales en la regulación de la elongación de las neuritas.

Sin embargo se abre la interrogante de cómo se activan las corrientes de Ca^{2+} durante el desarrollo, ya que el potencial de membrana de los conos de crecimiento parece permanecer entre -40 a -50 mV donde las corrientes de Ca^{2+} no se activan.

Otra interrogante por resolver es si la mayor densidad de la corriente encontrada en los conos de crecimiento se debe a una síntesis de canales tipo L o tipo N.

En contra de la hipótesis de que la síntesis de canales tipo N sea la responsable del incremento de la corriente de Ca^{2+} , se encuentran los experimentos de Streit y Lux (1990), basados en mediciones de la inactivación de la corriente. Su primer argumento es que si el aumento en la intensidad de la inactivación fuera causada por la expresión adicional de canales tipo N durante la diferenciación de las células PC12, uno podría esperar encontrar un paralelismo temporal entre el incremento en el pico de corriente y la fracción de inactivación. Sin embargo, el incremento en la fracción de inactivación es significativo en un estado de diferenciación donde el pico de corriente de las células en diferenciación no es mayor en amplitud que el de las células indiferenciadas.

El segundo argumento en contra es, que si se asumiera la co-existencia de canales tipo L y N para explicar la distribución heterogénea de la inactivación de la corriente en las células PC12, se esperaría que el curso temporal de la inactivación mostrara dos constantes de tiempo específicas a cada tipo de canal. El

tercer y último argumento es que si el grado de inactivación de la corriente de toda la célula fuera una medida de la distribución relativa de canales tipo L y N, se esperaría encontrar una correlación negativa entre el grado de inactivación de la corriente y el porcentaje de reducción de la corriente por nifedipina, ya que esta sólo bloquea los canales tipo L. Sin embargo, esta correlación no se encontró.

Furukawa y cols (1993) encuentran un incremento en la corriente de Ca^{2+} de las células PC12. Sin embargo, en contraposición con lo descrito por Streit y Lux, ellos muestran que una gran proporción de la corriente es bloqueada por ω -conotoxina.

III. CAMPOS MAGNETICOS

ANTECEDENTES HISTORICOS

El fenómeno del magnetismo fué conocido por los griegos desde el año 800 AC. Ellos descubrieron que ciertas piedras, ahora llamadas magnetita (Fe_3O_4), atraían pedazos de hierro. La leyenda adjudica el nombre de magnetita al pastor Magnes, ya que "los clavos de sus zapatos y el casquillo de su bastón quedaron fuertemente sujetos a un campo magnético cuando se encontraba pastoreando su rebaño".

En 1269 Pierre de Maricourt, mediante un imán natural esférico, elaboró un mapa de las direcciones tomadas por una aguja al colocarla en diversos puntos de la superficie de la esfera. Encontró que las direcciones formaban líneas que rodeaban a la esfera pasando a través de dos puntos diametralmente opuestos uno del otro, a los cuales llamó polos del imán. Experimentos subsecuentes demostraron que cualquier imán, sin importar su forma tiene dos polos, llamados polo norte y polo sur, los cuales presentan fuerzas que actúan entre sí de manera análoga a las cargas eléctricas. Es decir, polos iguales se repelen y polos diferentes se atraen.

En 1600 William Gilbert extendió estos experimentos a una variedad de materiales. El hecho de que una aguja magnética (brújula) se oriente en direcciones fijas, sugiere que la misma Tierra es un gran imán permanente. En 1750 John Michell (1724-1793) demostró que los polos magnéticos ejercen fuerzas de atracción y repulsión entre sí, y que estas fuerzas varían como el inverso del cuadrado de la distancia de separación. A un cuando la fuerza entre dos polos magnéticos es similar a la fuerza entre dos cargas eléctricas, existe una diferencia importante. Las cargas eléctricas se pueden aislar (lo que se manifiesta en la existencia del protón y el electrón), mientras que los polos magnéticos no se pueden separar. No importa cuántas veces se divida un imán permanente, cada trozo siempre tendrá un polo norte y un polo sur.

La relación entre el magnetismo y la electricidad fue descubierta en 1819 cuando el científico danés Hans Christian Oersted (1777-1851) encontró que la corriente eléctrica que circula por un alambre desvía la aguja de una brújula cercana. Poco tiempo después, André Ampère (1775-1836) obtuvo las leyes cuantitativas de la fuerza magnética entre conductores que llevan corrientes eléctricas. También sugirió que órbitas de corriente eléctrica de magnitud molecular son las responsables de todos los fenómenos magnéticos.

En la década de 1820, Faraday y Joseph Henry, de manera independiente, demostraron varias conexiones entre la electricidad y el magnetismo. Ellos comprobaron que se podía producir una corriente eléctrica en un circuito al mover un imán cercano al circuito o bien, variando la corriente de un circuito cercano al primero. Estas observaciones demuestran que un cambio en el campo magnético produce un campo eléctrico. Años después, el trabajo teórico realizado por Maxwell mostró que un campo eléctrico variable da lugar a un campo magnético.

DEFINICION Y PROPIEDADES DE UN CAMPO MAGNETICO

El campo eléctrico E en un punto del espacio se ha definido como la fuerza por unidad de carga que actúa sobre una carga de prueba colocada en ese punto. Del mismo modo, el vector de campo magnético B (algunas veces llamado inducción magnética o densidad de flujo magnético) es un punto dado del espacio en términos de la magnitud de la fuerza que sería ejercida sobre una partícula cargada que se mueve con velocidad v . Los experimentos realizados sobre el movimiento de diversas partículas cargadas que se desplazan en un campo magnético han proporcionado los siguientes resultados:

1. La fuerza magnética es proporcional a la carga q y la velocidad v de la partícula.
2. La magnitud y la dirección de la fuerza magnética depende de la velocidad de la partícula y de la magnitud y dirección del campo magnético.
3. Cuando una partícula se mueve en dirección paralela al vector campo magnético, la fuerza magnética F sobre la carga es cero.

4. Cuando la velocidad hace un ángulo con el campo magnético, la fuerza magnética actúa en una dirección perpendicular tanto a \mathbf{v} como a \mathbf{B} ; es decir, \mathbf{F} es perpendicular al plano formado por \mathbf{v} y \mathbf{B} .

5. La fuerza magnética sobre una carga positiva tiene un sentido opuesto a la fuerza que actúa sobre una carga negativa que se mueva en la misma dirección.

6. Si el vector velocidad hace un ángulo con el campo magnético, la magnitud de la fuerza magnética es proporcional al $\sin \theta$.

Estas observaciones se pueden resumir de la siguiente forma:

$$\mathbf{F} = q\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$$

donde la dirección de la fuerza magnética está en la dirección de $\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$, la cual por definición del producto vectorial es perpendicular tanto a \mathbf{v} como a \mathbf{B} (Figs 1.1, 1.2)

Como $\mathbf{F} = q\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$, \mathbf{F} está en la dirección de $\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$ si la carga q es positiva y tiene la dirección opuesta a $\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$ si la carga q es negativa. La magnitud de la fuerza magnética tiene un valor

$$F = qvB \sin \theta$$

donde θ es el ángulo entre \mathbf{v} y \mathbf{B} . De esta expresión, se ve que \mathbf{F} es cero cuando \mathbf{v} es paralelo a \mathbf{B} ($\theta = 0$ o $\theta = 180^\circ$). Sin embargo, la fuerza tiene su valor máximo, $\mathbf{F} = qv\mathbf{B}$, cuando \mathbf{v} es perpendicular a \mathbf{B} ($\theta = 90^\circ$)

En conclusión, el campo magnético es definido en términos de un tipo de fuerza que actúa sobre una carga en movimiento. Existen varias diferencias importantes entre las fuerzas eléctricas y magnéticas:

1.- La fuerza eléctrica siempre está en la dirección del campo eléctrico, mientras que la fuerza magnética es perpendicular al campo magnético.

2.- La fuerza eléctrica actúa sobre una partícula cargada independientemente de la velocidad de la partícula, mientras que la fuerza magnética actúa sólo cuando las partículas cargadas se encuentran en movimiento.

3.- La fuerza eléctrica realiza trabajo al desplazar una partícula cargada, mientras que la fuerza magnética asociada a un campo magnético estacionario no realiza trabajo cuando una partícula se desplaza.

En el Sistema Internacional la unidad de campo magnético es el weber por metro cuadrado (Wb/m^2), también llamado tesla (T). También puede ser relacionada con otras unidades fundamentales: una carga de un coulomb que se mueve a través de un campo magnético de 1 tesla con una velocidad de 1 m/s perpendicular al campo experimenta una fuerza de 1 newton:

$$[\mathbf{B}] = \text{T} = \text{Wb/m}^2 = \text{N/C} \cdot \text{m/s} = \text{N/A} \cdot \text{m}$$

Con frecuencia se utiliza la unidad llamada gauss (G), el cual esta relacionado con el tesla a través de la conversión:

$$1 \text{ T} = 10^4 \text{ G}$$

FUERZA MAGNETICA SOBRE UN CONDUCTOR QUE LLEVA UNA CORRIENTE ELECTRICA

Si se ejerce fuerza sobre una partícula cargada cuando se mueve a través de un campo magnético, no debe sorprender que un alambre que lleva una corriente también experimente una fuerza cuando se coloca en un campo magnético. Esto es debido a que la corriente representa una colección de varias partículas cargadas en movimiento; por lo tanto, la fuerza resultante sobre el alambre se debe a la suma de las fuerzas individuales sobre las partículas cargadas.

Considérese un segmento recto del alambre de longitud l y área de sección transversal A , llevando una corriente I en un campo magnético externo \mathbf{B} (Fig 1.3). La fuerza magnética de la carga q que se mueve con una velocidad \mathbf{v} está dada por $q\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$. La fuerza sobre el portador de carga se transmite al "grueso" del alambre a través de los choques contra los átomos que forman el alambre. Para determinar la fuerza total que actúa sobre el alambre se multiplica la fuerza sobre una carga $q\mathbf{v} \cdot \mathbf{B}$, por el número de cargas en el segmento. Como el volumen del segmento es Al , el número de cargas en el segmento es nAl , donde n es el número de cargas por unidad de volumen. Por lo tanto, la fuerza magnética total sobre un alambre de longitud l es

$$\mathbf{F} = (q\mathbf{v} \cdot \mathbf{B})nAl$$

Sin embargo, si recordamos que la corriente en un alambre está dada por $I = nq\mathbf{v}A$, podemos expresar \mathbf{F} como

$$\mathbf{F} = I\mathbf{l} \cdot \mathbf{B}$$

donde \mathbf{l} es un vector en la dirección de la corriente I ; la magnitud de \mathbf{l} es igual a la longitud l del segmento. Esta expresión se aplica sólo a segmentos rectos de alambre en un campo magnético externo uniforme.

LEY DE BIOT-SAVART:

CAMPO MAGNETICO PRODUCIDO POR UN ALAMBRE QUE LLEVA CORRIENTE

Después del descubrimiento de Oersted en 1819, donde la aguja de la brújula se desviaba a causa de la presencia de un conductor portador de corriente, Jean Baptiste Biot y Felix Savart informaron que un conductor de corriente estable produce fuerzas sobre un imán. De sus resultados experimentales, Biot y Savart fueron capaces de llegar a una expresión de la que se obtiene el campo magnético en un punto dado del espacio en términos de la corriente que produce el campo. La ley de Bio-Savart establece que si un alambre conduce una corriente constante I , el campo magnético $d\mathbf{B}$ en un punto P debido a un elemento $d\mathbf{s}$ tiene las siguientes propiedades:

1. El vector $d\mathbf{B}$ es perpendicular tanto a $d\mathbf{s}$ (el cual tiene la dirección de la corriente) como al vector unitario \mathbf{r}' dirigido desde el elemento hasta el punto P .
2. La magnitud $d\mathbf{B}$ es inversamente proporcional a r'^2 , donde r' es la distancia desde el elemento hasta el punto P .
3. La magnitud $d\mathbf{B}$ es proporcional a la corriente y a la longitud $d\mathbf{s}$ del elemento.
4. La magnitud de $d\mathbf{B}$ es proporcional a $\sin \theta$, donde θ es el ángulo entre el vector $d\mathbf{s}$ y \mathbf{r}' .

La ley de Bio-Savart puede ser resumida en la siguiente forma

$$d\mathbf{B} = K_m (I d\mathbf{s} \cdot \mathbf{r}' / r'^2)$$

donde K_m es una constante que en el Sistema Internacional de unidades es exactamente 10^{-7} Wb/A·m. La constante K_m es por lo general escrita como $\mu_0/4\pi$, donde μ_0 es otra constante llamada permeabilidad del espacio libre. Es decir,

$$\mu_0/4\pi = K_m = 10^{-7} \text{ Wb/A} \cdot \text{m}$$

Por lo que la ley de Bio-Savart, también puede escribirse como:

$$dB = (\mu_0/4\pi) (I ds \cdot r'/r^2)$$

Es importante hacer notar que la ley de Bio-Savart proporciona el campo magnético en un punto dado para un pequeño elemento del conductor. Para encontrar el campo magnético total B en algún punto debido a un conductor de tamaño finito, se deben sumar las contribuciones de todos los elementos de corriente que constituyen el conductor. Esto es, debe evaluarse B por la integración de la ecuación anterior

$$B = (\mu_0 I/4\pi) \int ds \cdot r'/r^2$$

donde la integral se evalúa sobre todo el conductor. Esta expresión debe ser manejada con especial cuidado desde el momento que el integrando es una cantidad vectorial.

Se presentan rasgos similares entre la ley de Bio-Savart del magnetismo y la ley de Coulomb en la electrostática. El elemento de corriente $I ds$ produce un campo magnético, mientras que una carga puntual q produce un campo eléctrico. Además, la magnitud del campo magnético es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia desde el elemento de corriente, como lo hace el campo eléctrico debido a una carga puntual.

Sin embargo, las direcciones de los dos campos son muy diferentes. El campo eléctrico debido a una carga es radial. En el caso de una carga puntual positiva, E está dirigido desde la carga hacia el punto del campo. El campo magnético debido a un elemento de corriente es perpendicular tanto al elemento de corriente como al radio vector.

Considérese un alambre conductor recto, muy delgado, que lleva una corriente I colocado a lo largo del eje x , como la muestra la figura 1.5. Si se quisiera calcular el campo magnético en el punto P localizado a una distancia a del alambre, se deben tener en cuenta las siguientes premisas:

1. El elemento ds está a una distancia r de P .
2. La dirección del campo en P debida a este elemento es hacia afuera del papel, ya que $ds \cdot r'$ está hacia afuera del papel.
3. De hecho, todos los elementos dan una contribución dirigida hacia afuera del papel en P . Por lo tanto se tiene que determinar sólo la magnitud del campo en P .

Si se considera O como el origen y P situado sobre el eje y^+ , con k siendo el vector unitario dirigido hacia afuera del papel, se ve que

$$ds \cdot r' = k | ds \cdot r' | = k (dx \text{ sen}\theta)$$

sustituyendo y dado que $dB = k dB$

$$dB = (\mu_0 I/4\pi) dx \cdot \text{sen } \theta/r^2$$

Para integrar esta expresión se deben relacionar las variables θ , x y r , expresando x y r en términos de θ .

$$r = a/\text{sen } \theta = a \text{ csc } \theta$$

Ya que $\tan \theta = -a/x$

$$x = -a \cot \theta$$

$$dx = a \csc^2 \theta d\theta$$

sustituyendo se obtiene

$$dB = (\mu_0 I/4\pi)(a \csc^2 \theta \sin \theta d\theta / a^2 \csc^2 \theta) = (\mu_0 I/4\pi a) \sin \theta d\theta$$

Ahora se puede obtener el campo magnético total en el punto P integrando sobre todos los elementos que subtenden ángulos comprendidos entre θ_1 y θ_2 .

$$B = (\mu_0 I/4\pi a) \int_{\theta_1}^{\theta_2} \sin \theta d\theta = (\mu_0 I/4\pi a) (\cos \theta_1 - \cos \theta_2)$$

Considérese el caso especial de un alambre conductor delgado, infinitamente largo. En este caso $\theta_1 = 0$ y $\theta_2 = \pi$, para segmentos que van desde $x = -\infty$ hasta $x = +\infty$. Como $(\cos \theta_1 - \cos \theta_2) = (\cos 0 - \cos \pi) = 2$, la ecuación anterior se convierte en

$$B = (\mu_0 I/2\pi a)$$

En la figura 2.1 se muestra una vista tridimensional de la dirección de B para un alambre recto y largo. Las líneas de campo son círculos concéntricos con el alambre y están en un plano perpendicular al alambre. La magnitud del campo magnético B es constante en cualquier círculo de radio a y esta dada por la ecuación anterior. Una regla conveniente para determinar la dirección de B es tomar el alambre con la mano derecha, con el dedo pulgar a lo largo de la dirección de la corriente. Los cuatro dedos restantes apuntarán en la dirección del campo magnético.

FUERZA MAGNETICA ENTRE DOS CONDUCTORES PARALELOS

Como una corriente en un conductor crea su propio campo magnético, es fácil entender que dos conductores que lleven corriente ejercerán fuerzas magnéticas uno sobre el otro. Considérese dos alambres largos, rectos y paralelos separados una distancia a y que llevan corrientes I_1 e I_2 en la misma dirección (Fig. 2.2). Se puede determinar la fuerza sobre uno de los alambres debida al campo magnético producido por el otro alambre. El alambre 2, el cual lleva una corriente I_2 , genera un campo magnético B_2 en la posición del alambre 1. La dirección de B_2 es perpendicular al alambre.

1. La fuerza magnética sobre una longitud l del alambre 1 es $F_1 = I_1 l \cdot B_2$
2. Puesto que l es perpendicular a B_2 , la magnitud de F_1 está dada por $F_1 = I_1 l \cdot B_2$
3. Como el campo debido al alambre 2 está dado por $B_2 = (\mu_0 I_2/2\pi a)$

entonces

$$F_1 = I_1 l B_2 = I_1 l (\mu_0 I_2/2\pi a) = l \mu_0 I_1 I_2/2\pi a$$

Esto se puede reescribir en términos de la fuerza por unidad de longitud como

$$F_1 / l = \mu_0 I_1 I_2/2\pi a$$

La dirección de F_1 es hacia el alambre 2. Si se considera el campo sobre el alambre 2 debido al alambre 1, la fuerza F_2 sobre el alambre 2 es igual y opuesta a F_1 . Cuando las corrientes están en direcciones opuestas, las fuerzas son inversas y los alambres se repelen uno al otro. Por ello se determina que:

conductores paralelos que lleven corriente en la misma dirección se atraen uno al otro, mientras que conductores paralelos que lleven corrientes en direcciones opuestas se repelen uno al otro.

La fuerza entre dos alambres paralelos que lleven corriente se utiliza para definir el ampere como sigue:

Si dos alambres largos paralelos separados una distancia de 1m llevan la misma corriente y la fuerza por unidad de longitud en cada alambre es de 2×10^{-7} N/m, entonces la corriente que llevan se define como 1 A.

EL CAMPO MAGNETICO DE UN SOLENOIDE

Un solenoide es un alambre devanado en la forma de una hélice. Con esta configuración se puede producir un campo magnético razonablemente uniforme dentro de un pequeño volumen de la región interior del solenoide si las espiras adyacentes están estrechamente espaciadas. Cuando se cumple esto, cada espira puede ser considerada como un circuito circular, y el campo magnético total es el vector suma de los campos debidos a todas las espiras.

En la figura 2.3 se muestra las líneas del campo magnético de un solenoide devanado en forma estrecha. Las líneas del campo en el interior de la bobina son aproximadamente paralelas, están distribuidas de manera uniforme y muy próximas entre sí. Esto indica que el campo magnético dentro del solenoide es uniforme. Las líneas de campo entre vueltas tienden a cancelarse unas con otras. El campo en puntos del exterior, tales como P, es débil puesto que el campo debido a un elemento de corriente en las partes superiores tiende a cancelarse con el campo atribuible a elementos de corriente que estén en las partes inferiores.

Si las espiras están muy próximas y el solenoide tiene una longitud finita, las líneas de campo son como se muestra en la figura 2.4. En este caso, las líneas divergen en un extremo y convergen en el extremo opuesto. Si se observa esta distribución del campo en el exterior del solenoide, se encontrará cierta similitud con el campo de una barra magnética. En consecuencia, un extremo del solenoide se comporta como el polo norte de un imán, mientras que el extremo opuesto actúa como el polo sur. A medida que aumenta la longitud del solenoide, el campo en su interior viene a ser más y más uniforme.

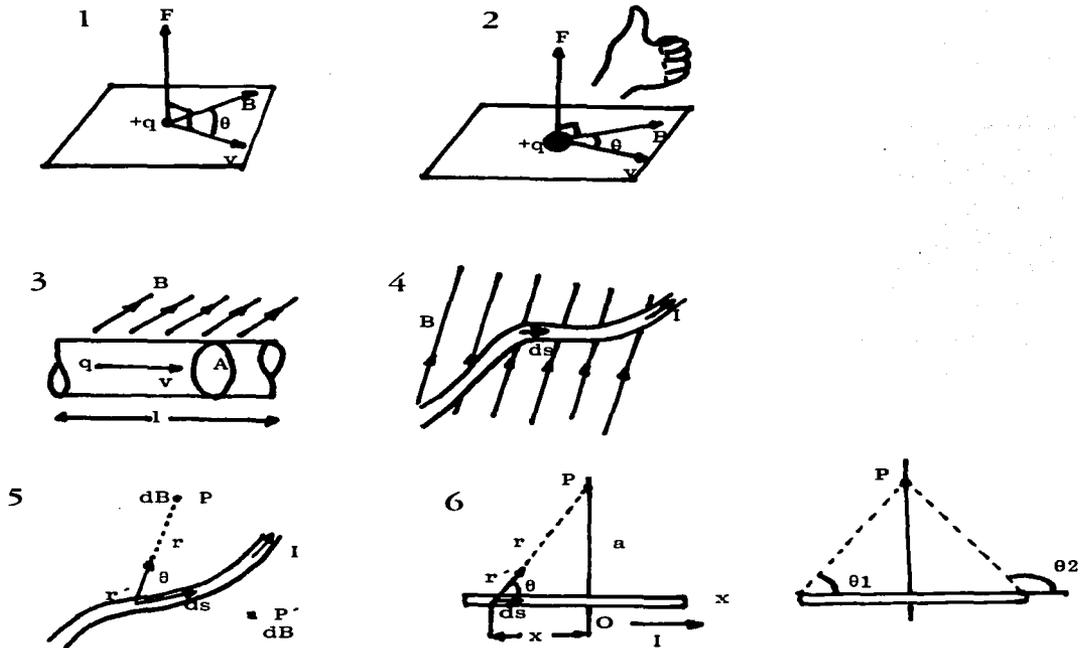


FIGURA 1: Propiedades de un campo magnético. (1) Dirección de la fuerza magnética sobre una partícula cargada que se mueve con velocidad v en presencia de un campo magnético. Cuando v forma un ángulo θ con B , la fuerza magnética es perpendicular a ambos, v y B . (2) Regla de la mano derecha para determinar la dirección de la fuerza magnética F que actúa sobre una carga q que se mueve con una velocidad v en un campo magnético B . Si q es positiva, F queda hacia arriba en la dirección del pulgar, si q es negativa, F es hacia abajo. (3) Sección de un alambre que contiene cargas moviéndose en un campo magnético externo B . (4) Un alambre de forma arbitraria que lleve una corriente I en un campo magnético externo B experimenta una fuerza magnética. La fuerza magnética sobre cualquier segmento ds está dada por $I ds \cdot B$. (5) El campo magnético dB en el punto P debido a un elemento de corriente ds está dado por la ley de Biot-Savart. El campo está hacia afuera del papel en P . (6) Un segmento de alambre recto lleva una corriente I . El campo magnético en P debido a cada elemento ds está dirigido hacia afuera del papel, y por lo tanto el campo total también está dirigido hacia afuera del papel. Se muestran los ángulos límite θ_1 y θ_2 . (Tomadas de Serway, 1993)

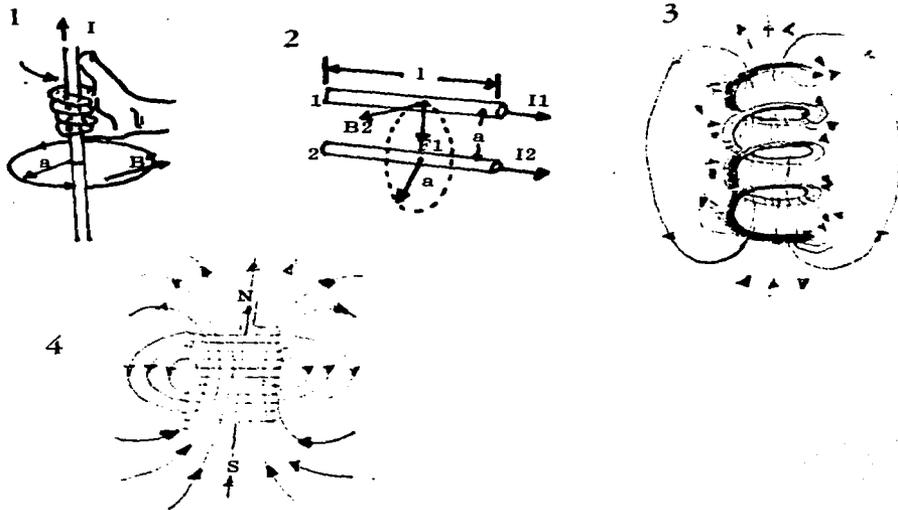


FIGURA 2: (1) La regla de la mano derecha para determinar la dirección del campo magnético debido a un alambre recto y largo. Obsérvese que las líneas de campo magnético forman círculos alrededor del alambre. (2) Dos alambres paralelos que llevan cada uno una corriente estable ejercen una fuerza uno sobre el otro. El campo B_2 en el alambre 1 debido al alambre 2 produce una fuerza sobre el alambre 1 dada por $F_1 = I_1 B_2$. La fuerza es atractiva si las corrientes son paralelas como se muestra y repulsiva si las corrientes son antiparalelas. (3) Líneas de campo magnético para un solenoide devanado estrechamente de longitud finita y que lleva una corriente estable. El campo en el interior del solenoide es intenso y aproximadamente constante. Obsérvese que las líneas de campo se asemejan a las de un imán de barra, de manera que el solenoide tiene polos norte y sur. (Tomadas de Serway, 1993)

IV. CAMPOS MAGNETICOS Y SISTEMAS BIOLÓGICOS

El estudio de los efectos biológicos de los campos magnéticos data de mediados del siglo XVIII con los experimentos de Galvani (1737-1798). En los últimos 25 años esta línea de investigación ha sido retomada. Recientemente se ha dado especial importancia a algunos estudios epidemiológicos que vinculan la exposición a campos magnéticos con una mayor incidencia de ciertos tipos de cáncer. Así mismo, se ha tratado de investigar más acerca de su potencial terapéutico y su posible aplicación en el diagnóstico médico.

Sin embargo, el estudio del magnetismo ha enfrentado algunos problemas: a) la intensidad y frecuencia del campo magnético con el que se han realizado los experimentos generalmente varía de un grupo de investigación a otro, por lo que es difícil hacer comparaciones entre los distintos modelos experimentales, b) los resultados obtenidos frecuentemente son contradictorios, especialmente cuando se trata de datos epidemiológicos en los que algunos grupos argumentan un potencial carcinogénico y otros lo niegan por completo.

En diferentes modelos experimentales se ha observado, que la estimulación magnética no guarda una relación dosis-respuesta; es decir, los efectos biológicos provocados por la exposición a campos magnéticos no muestran un incremento lineal con respecto a la intensidad o amplitud del campo. En algunos experimentos se observa la existencia de "ventanas" de frecuencia o intensidad. De acuerdo con el concepto de "ventana" los efectos sólo son visibles en algunas frecuencias o intensidades y por debajo o por arriba de estas los efectos desaparecen.

FRECUENCIA

El campo magnético generado en una bobina por la que se hace pasar una corriente I , oscila de acuerdo a la frecuencia de la corriente alterna que alimenta a la bobina. Se define a la frecuencia de una corriente alterna, como el número de ciclos completos en cada segundo. La gran mayoría de circuitos comerciales de corriente alterna tienen corrientes de 60 ciclos por segundo o de 60 Hz. (1 Hz = 1 ciclo por segundo). También se puede definir la frecuencia como el inverso del periodo, el cual es el intervalo de tiempo que tarda en completarse un ciclo.

Existen múltiples clasificaciones para agrupar las diferentes bandas de frecuencia en el espectro electromagnético, pero haremos referencia a la propuesta por Adey (1981) (Tabla 1). La mayoría de los efectos observados se han producido con la exposición a campos magnéticos de extremadamente baja frecuencia (ELF por sus siglas en inglés), dentro de los cuales se agrupan las frecuencias existentes en las líneas de alta tensión y en los aparatos electrodomésticos.

DC	-	300 Hz	Extremadamente baja frecuencia	(ELF)
300 Hz	-	10 kHz	Muy baja frecuencia	(VLF)
10 kHz	-	1 MHz	Baja frecuencia	(LF)
1 MHz	-	30 MHz	Alta frecuencia	(HF)
30 MHz	-	300 MHz	Muy alta frecuencia	(VHF)
300 MHz	-	1000 MHz (1 GHz)	Ultra alta frecuencia	(UHF)
1 GHz	-	3000 GHz	Microondas	(MW)

INTENSIDAD

La intensidad de un campo magnético está definida por la cantidad vectorial

$$H = (B - \mu_0) - M$$

donde M es la magnitud del vector de magnetización que es igual al momento magnético por unidad de volumen de una sustancia. Las unidades de H en el Sistema Internacional son amperios/m.

Sin embargo, frecuentemente se expresa la intensidad del campo magnético en teslas (T) que, como ya se mencionó, es la unidad de un campo magnético en el Sistema Internacional.

El campo magnético natural de la Tierra es de 30 μ T. (ver revisión Adey, 1981).

RESPUESTAS CELULARES A LOS CAMPOS MAGNETICOS (CM)

Aunque existen experimentos en los que el efecto de los campos magnéticos parece ser inexistente, hay evidencias que demuestran tanto *in vitro* como *in vivo* que los campos magnéticos pueden producir respuestas biológicas significativas. Con el fin de entender los efectos producidos por el campo magnético se han propuesto varias explicaciones.

La mayoría de los autores proponen que la membrana celular es el sitio primario de interacción célula-campo magnético y que el efecto se transduce a través de algún mecanismo de transducción de señales, similar a aquellos utilizados por ligandos extracelulares. También se ha observado que durante la estimulación con campos magnéticos hay alteraciones de las concentraciones intra y extracelulares de Ca^{2+} (revisado por Goodman y cols, 1995).

Otra posible explicación sugiere que la estimulación con campo magnético modifica los procesos normales de señalización celular en la membrana (Luben, 1982). Blank y cols, proponen un modelo electroquímico en el que el campo magnético induce cambios en la actividad de algunas enzimas (Blank y Soo, 1992).

Otros autores no atribuyen explícitamente a la membrana celular los efectos del campo magnético. Weaver y Astumian (1992), por ejemplo, proponen un mecanismo en el cual los campos magnéticos pueden alterar las constantes de reacción, por lo que los niveles de metabolitos deben variar con el tiempo. También se piensa que la formación de radicales libres inducida por el campo magnético podría afectar las constantes de las reacciones bioquímicas dentro de las células (Scaliano y cols, 1995).

CELULAS ENDOCRINAS

Jolley y cols (1983), expusieron islotes pancreáticos de conejo, a un CM pulsátil generado por bobinas de Helmholtz y midieron los flujos de $^{45}Ca^{2+}$ precargado en las células. La estimulación consistía en ráfagas de pulsos cuadrados con una frecuencia de 4 kHz y una duración de 5 ms. Estos autores encontraron que las células expuestas al CM mostraban una reducción del 26.1% en la acumulación de $^{45}Ca^{2+}$, una disminución del 25.1% del eflujo de $^{45}Ca^{2+}$ durante la estimulación con glucosa, así como una reducción de la cantidad de insulina liberada por estimulación con glucosa. Estos experimentos sugieren que la estimulación con CM produce alteraciones en el movimiento de iones a través de la membrana. Los autores atribuyen estas alteraciones a posibles gradientes eléctricos producidos por el CM. Cabe señalar que no mencionan la intensidad del CM generado.

Utilizando parámetros morfológicos, Drucker-Colín y cols (1994) describieron un método de diferenciación celular que consiste en estimular células cromafines en cultivo, con CM de 60 Hz de frecuencia y 7 G de intensidad, durante 4 horas diarias. Las células cromafines emiten procesos neuríticos semejantes a los producidos por estimulación con NGF. Además, conservan su capacidad de secreción de 3H -noradrenalina al ser despolarizadas con alto KCl.

LINFOCITOS

Conti y cols (1985), investigaron el efecto del CM en linfocitos activados con los mitógenos fitohemaglutinina y acetato de forbol miristato (PMA). La estimulación magnética consistió en pulsos cuadrados con una frecuencia de 3 Hz y una intensidad de 60 G, durante 72 hr. La exposición a CM inhibió de manera significativa la incorporación de 3H -Timidina en los linfocitos tratados con los mitógenos. Esta inhibición se potenció por la adición de verapamil, un bloqueador de canales de Ca^{2+} . La estimulación con los mitógenos aumenta la recaptura de $^{45}Ca^{2+}$, sin embargo la estimulación con CM redujo esta recaptura a los niveles del control (linfocitos no activados). Estos experimentos ponen de manifiesto la importancia del Ca^{2+} en la síntesis de DNA inducida por los mitógenos. Además, demuestra de manera indirecta que el CM es capaz de alterar los flujos de Ca^{2+} en la membrana, ya que se inhibe la síntesis de DNA inducida por PMA, que se sabe es dependiente de calcio extracelular.

Lyle y cols (1991), expusieron linfocitos T normales y leucémicos durante 30 minutos a un CM de 13.6 Hz y 20 μ T. Ellos muestran que la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ se incrementó 102% en una línea celular de linfocitos T citotóxicos de ratón, 126% en linfocitos aislados del bazo y 75% en una línea de células de linfoma. Cuando el mismo campo fue aplicado 30 minutos antes de la incorporación de iones calcio no se observó ningún efecto. En otro experimento expusieron linfocitos de bazo a un CM de 60 Hz y 20 μ T durante 30 min. de incubación con $^{45}\text{Ca}^{2+}$, y observaron un pequeño pero significativo aumento de la captura de iones marcados. Este aumento en la captura de Ca^{2+} provocado por la exposición a CM a determinadas frecuencias, puede ser el responsable de potenciar o inhibir algunas funciones celulares como la proliferación en linfocitos normales o malignos. Los autores especulan sobre todos los posibles niveles en los que esta elevación de las concentraciones de Ca^{2+} pudiera estar actuando.

Liburdy (1992) realizó experimentos en linfocitos de timo activados con el mitógeno concanavalina A expuestos a un CM de 60 Hz y 22 mT durante 60 min. Mediante la sonda fluorescente Fura-2, midió en tiempo real el flujo de Ca^{2+} . Los timocitos activados y expuestos a campo magnético mostraron un incremento en el flujo de Ca^{2+} con respecto a aquellos activados pero sin estimulación magnética. Cuando los timocitos se encontraban en un medio libre de Ca^{2+} , la presencia del CM no afectó el aumento inicial de la concentración de Ca^{2+} intracelular observado por la sola aplicación de concanavalina A. Sin embargo, cuando se añadió Ca^{2+} al medio en estas mismas células, se observó un incremento en el flujo de Ca^{2+} . Este hecho sugiere que el CM interactúa con los canales de calcio de la membrana plasmática y no con los depósitos celulares internos para producir este aumento de Ca^{2+} .

También en linfocitos de timo, Walleczek y Budinger (1992) encontraron resultados contrarios a los anteriores. Estos autores evaluaron la captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ al exponer linfocitos de timo a un CM rectangular de 3 Hz, 6.5 mT durante 30 min. Los linfocitos activados con concanavalina A normalmente capturan mayor cantidad de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (53% respecto a los no activados). En presencia del campo magnético esta captura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en los linfocitos activados se redujo un 45%. En los linfocitos que no respondieron a la concanavalina A, la exposición a campo magnético produjo un incremento de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ del 39% comparado con aquellos que no respondieron y no fueron expuestos a campo magnético. En ausencia de concanavalina A (linfocitos en G_0), no hubo ningún efecto significativo por la aplicación de campo magnético. Esto sugiere que la respuesta de los linfocitos a la estimulación con campos magnéticos depende del estadio del ciclo celular en el cual se encuentren.

En trabajos posteriores, se ha confirmado que los linfocitos en reposo (G_0) no responden a los campos magnéticos y que sólo aquellas células activadas por algún mitógeno y con alguna vía señalización que involucre al calcio intracelular activada, responden a la estimulación con campos magnéticos, por lo que se propone que la transducción de señales que involucra calcio es biológicamente importante para mediar los efectos de la interacción con el campo (Yost y Liburdy, 1992; Liburdy y cols, 1993).

Por otra parte, existen en la literatura reportes en los que usando la sonda fluorescente Quin-2 no se encuentran cambios de concentración intracelular de Ca^{2+} de los linfocitos, cuando estos son expuestos a diversas condiciones de CM (Coulton y Barker, 1993).

Liburdy y cols (1993) suponen que el Ca^{2+} intracelular es el parámetro fisiológico directamente afectado por la estimulación con CM. Por ello estos autores trataron de identificar una posible consecuencia biológica de la alteración del movimiento de Ca^{2+} . En linfocitos activados con concanavalina A, observaron la inducción específica del RNA mensajero para el proto-oncogen c-MYC por la estimulación de un CM de 60 Hz y 20 mT durante 60 min. Esta inducción es específica ya que el gen constitutivo para GAPDH no mostró un incremento en su expresión. Los autores descartan que la concanavalina A, induzca a c-MYC, ya que utilizan concentraciones subóptimas a las utilizadas para inducir mitosis.

Por otra parte, en células linfoides inmortalizadas por el virus Epstein-Barr y en linfocitos normales expuestos a campo magnético de 50 Hz, 10 μ T y 1 mT, Desjobert y cols (1993) no encuentran diferencias en los niveles de transcrito para c-MYC

Debido a que algunos reportes epidemiológicos vinculan la exposición a campos magnéticos con el desarrollo de cáncer, Morandi y cols (1994) estudiaron el papel de las interleucinas (IL) 1 y 6, moléculas encargadas de la comunicación celular del sistema inmune. La disminución en la producción de interleucinas está relacionada con una respuesta inmune deficiente, mientras que un incremento en la producción de estas moléculas está relacionado con un proceso inflamatorio. Los autores expusieron a un campo magnético a macrófagos provenientes de un exudado peritoneal de ratón y realizaron mediciones de IL-1 a las 24 de exposición y de IL-6 a las 48 horas, por medio de la técnica de ELISA. El campo magnético empleado tenía

una frecuencia de 60 Hz, y una intensidad de 0.3 mT. Los resultados demostraron que la producción de IL-1 e IL-6 no es afectada por la exposición a campos magnéticos, eléctricos o electromagnéticos. Sin embargo los autores no descartan la posibilidad de que aumentando el tiempo de exposición al campo, o la frecuencia o intensidad, probablemente se podrían tener resultados diferentes.

	TIPO CELULAR	METODO	HALLAZGO	FRECUENCIA	INTENSIDAD
Jolley y cols 1983	islotos pancreáticos	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	disminución de la captura, disminución del eflujo por estimulación con glucosa	4 kHz	No especificada
Conti y cols 1985	linfocitos	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	disminución de la captura	3 Hz	6 mT
Lyle y cols 1991	linfocitos	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	aumento de la captura	13.6 Hz	20 μT
Liburdy 1992	linfocitos	Fura-2	incremento en el influjo	60 Hz	22 mT
Wallaczek y Budinger, 1992	linfocitos	$^{45}\text{Ca}^{2+}$	disminución en la captura	3 Hz	6.5 mT
Coulton y Barker, 1993	linfocitos	Quin-2	sin cambios	16 Hz y 50 Hz	
Lindstrom y cols 1995	linfocitos T leucémicos	Fura-2	oscilaciones de Ca^{2+}	50 Hz	0.15 mT

NEURONAS

En neuronas sensoriales de ratón cultivadas y despolarizadas con pulsos de corriente de amplitud constante, se ha observado que la exposición a un campo magnético de 11 mT reduce la capacidad del pulso despolarizante para producir un potencial de acción en un 66%. Este efecto se disminuye aumentando la distancia de los magnetos en el plano XY, debido posiblemente a variaciones en la intensidad del campo (McLean y cols, 1995). Estos datos son apoyados por experimentos en los que se varían las condiciones espaciales y de intensidad del campo y se observa la capacidad del campo magnético para inhibir los potenciales de acción en neuronas sensoriales (Cavopoli y cols, 1995).

LÍNEAS CELULARES

Korzh-Sleptsova y cols (1995), expusieron células Jurkat (linfocitos T leucémicos) a un campo magnético de 50 Hz de frecuencia y 0.10 mT de intensidad. Los autores encontraron un incremento significativo de los niveles de 1, 4, 5-inositol trifosfato (IP3), el cual se presentaba inmediatamente después de la aplicación del CM y era máximo a los dos minutos. La preincubación de las células con el quelante de Ca^{2+} BAPTA/AM no afecta el incremento de IP3 producido por la exposición al CM. Si bien la formación de IP3 está directamente relacionada con la activación de la $\text{PLC}_{\gamma 1}$, los autores discuten el hecho de que la quelación del calcio intracelular inhabilitaría a las $\text{PLC}_{\gamma 1}$ para activarse ya que requiere de Ca^{2+} , por lo que posiblemente el CM esté actuando a través de otro mecanismo para activar a la lipasa.

En la búsqueda de posibles sitios de acción del CM, Lindstrom y cols (1995) han trabajado también con células Jurkat, de las cuales se conoce gran parte de la vía de transducción de señales, desde la activación del receptor de la célula T, hasta la transcripción de varios genes. Algunas proteínas relacionadas con la fosforilación/desfosforilación de tirosinas están involucradas en el reconocimiento del antígeno por el complejo del receptor/CD3. Dentro de estas proteínas se encuentran las tirosina cinasas ZAP-70 y Syk, así como miembros de la familia de tirosinas src, p56^{lck} y p59^{lyn}, y la tirosina fosfatasa CD45. Inmediatamente después de la activación del receptor, se observa la fosforilación de la $\text{PLC}_{\gamma 1}$, la cual produce DAG e IP3

provocando un incremento de Ca^{2+} intracelular. Los autores expusieron células Jurkat a un CM de 50 Hz de frecuencia y 0.15 mT de intensidad y midieron mediante fura-2 las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Encontraron que las concentraciones de Ca^{2+} oscilaban durante la exposición al CM. Cuando expusieron al CM una clona de células Jurkat que carece de la fosfatasa CD45, no observaron oscilaciones de Ca^{2+} intracelular y cuando transfectaron células de esta clona con el dominio activo de la fosfatasa, observaron que las oscilaciones fueron restauradas. Los autores discuten el posible significado de estos resultados. Al parecer, el CM interfiere con los procesos de fosforilación/desfosforilación de proteínas, sin embargo el blanco de estos efectos no tiene que ser necesariamente CD45, sino algún paso hacia arriba de la cascada, como la estimulación de CD3. Los autores no descartan que la elevación de la temperatura producida por el CM esté provocando estos efectos.

Saffer y Thurston (1995) observaron en la línea celular de linfocitos HL60 y en células Daudi de linfoma que no existen cambios en la expresión del gen humano MYC o en los niveles de RNA mensajero de beta-actina cuando son expuestas a campos magnéticos de 60 Hz con intensidades en el rango de 5.7 μT a 10 mT.

Dixey y Rein (1982) y cuantificaron la liberación de ^3H - noradrenalina de células de feocromocitoma de rata PC12, bajo la estimulación de un campo magnético pulsátil. Cada pulso tenía una duración de 0.6 ms y se repetía cada 1.4 ms. La frecuencia del CM fué de 500 Hz, con una intensidad máxima de 8.5 G (8.5×10^{-4} T). Estos autores observaron un incremento de la liberación durante el período de estimulación con campos magnéticos. Este incremento fué inhibido por la presencia de Mg^{2+} extracelular, lo que sugiere una dependencia de Ca^{2+} extracelular. Sin embargo, los autores descartaron que el campo magnético fuera capaz de inducir la entrada de Ca^{2+} a través de despolarización, ya que calcularon que el campo eléctrico que se genera es inferior al asociado con un potencial de acción.

En células de melanoma humano MeWo, la exposición a campos magnéticos de 50 Hz de frecuencia y 400 mT induce un incremento en la frecuencia de mutaciones en el gen de hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa. La frecuencia de estas mutaciones es mayor cuando se aumenta el periodo de exposición y la intensidad del campo magnético. Una posible explicación de este incremento en las mutaciones, es la existencia de errores durante la replicación del DNA, ya que cuando las células fueron tratadas previamente con arabinofuranosilcitosina, un inhibidor de la síntesis de DNA, no se observaron diferencias en la frecuencia de aparición de la mutación con respecto a las células control (Miyakoshi y cols, 1996).

ESTUDIOS IN VIVO

En trabajos de cáncer de mama se ha observado que el crecimiento de un tumor esta asociado con el incremento de la actividad de la ornitina descarboxilasa, enzima clave en la síntesis de poliaminas, las cuales participan en la proliferación celular y en el control de la expresión génica. Cuando se expusieron ratas hembras a un campo magnético de 50 Hz y 50 μT durante seis semanas, la actividad de la ornitina descarboxilasa en mama se incrementó casi al doble, a niveles muy similares a los producidos por el agente carcinógeno DMBA. El tratamiento simultáneo con DMBA y CM aumentó la actividad de la enzima al nivel producido por cada tratamiento por separado (Mevissen y cols, 1995). Los autores sugieren que el CM puede actuar más que como un promotor de la formación de tumores, como un agente copromotor.

Thompson (1995), cuantificó las concentraciones plasmáticas de cortisol de ovejas expuestas a campos eléctricos y magnéticos producidos por una línea de alta tensión de corriente alterna, con el fin de observar si la secreción de cortisol es afectada en estas condiciones. El campo magnético calculado fué de 40 mG de intensidad y 60 Hz de frecuencia. Las concentraciones plasmáticas de cortisol de las ovejas expuestas a los campos magnéticos y eléctricos no tuvieron ninguna alteración con respecto a las concentraciones de los animales control.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La estimulación con campos magnéticos (CM), produce una gran variedad de efectos en algunos de los sistemas en que ha sido empleada. Estos efectos incluyen desde acelerar la regeneración de tendones y nervios (Rusovan y cols, 1992; Berg, 1992) y disminuir los síntomas de la enfermedad de Parkinson (Sandyk, 1992), hasta alterar los flujos de Ca^{2+} en linfocitos (Lyle y cols, 1991; Walleczek y Budinger, 1992; Jolley y cols, 1983) o provocar crecimiento neurítico en células cromafines (Drucker-Colin y cols, 1994) y en células PC12 (Blackman y cols, 1993). Los mecanismos celulares que median estas respuestas no se conocen del todo, pero algunas evidencias experimentales indican que el Ca^{2+} podría jugar un papel muy importante en la producción de dichos efectos. En linfocitos se ha propuesto a su vez que el CM altera la expresión de c-myc, c-jun y c-fos, y que de alguna manera induce la activación de la cinasa de proteínas dependiente de Ca^{2+} (PKC) (Liburdy y cols, 1991, Kavalliers y cols, 1991).

Al estudiar la neurogenización inducida por estimulación con CM, la comparación con la inducida por NGF es inevitable. A diferencia de la estimulación con CM, actualmente se conocen muchos de los eventos que resultan de la unión del NGF a su receptor. Por ejemplo, la aplicación de NGF cerca de los cuerpos celulares de neuronas ganglionares, produce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} (Eichler y cols, 1992), aún en un medio libre de este ión, lo que sugiere la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares (Yamashita y Kawana, 1991). También se ha observado que en células PC12 la aplicación crónica de NGF modifica el patrón de expresión de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} . Estas células poseen en su forma indiferenciada canales altamente sensibles a dihidropiridinas, sin embargo, esta sensibilidad disminuye a lo largo del tiempo de tratamiento con NGF ya que aumenta la expresión de canales de Ca^{2+} no sensibles a dihidropiridinas (Takahashi y cols, 1985, Furukawa, 1993). También en células PC12, Nikodijevic y Guroff (1991) observaron que el tratamiento con NGF provoca un incremento en la recaptura de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, el cual es máximo después de 5 minutos de la aplicación del NGF. Este incremento en la recaptura es parcialmente inhibido por bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L. Estos datos indican que la diferenciación producida por NGF se acompaña de cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} .

Existen otros factores que son capaces de producir crecimiento neurítico en células cromafines y PC12, como el AMP cíclico, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Connolly y cols, 1984), la trasfección de ras o de la cinasa de tirosinas src. Las células PC12 diferenciadas con NGF o transfectadas con src poseen corrientes de Ca^{2+} insensibles a dihidropiridinas (Rausch y cols, 1990). En neuronas, la aplicación del anticuerpo contra la glucoproteína de superficie Thy-1 produce crecimiento neurítico, el cual es dependiente de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L y N (Doherty y cols, 1993).

Si concebimos el crecimiento neurítico como un proceso que depende de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} podemos suponer que los diferentes factores inductores de neurogenización podrían alterar estas concentraciones a través de distintos mecanismos. Partiendo de esta suposición y basados en los antecedentes de otros tipos celulares, los experimentos realizados en este trabajo pretendieron esclarecer si el Ca^{2+} participa en la neurogenización de las células cromafines estimuladas con CM y qué tipos de canales de calcio sensibles al voltaje se encuentran involucrados.

OBJETIVOS

Considerando la importancia del calcio en los procesos asociados a la estimulación con campos magnéticos, y con el fin de establecer los posibles mecanismos a través de los cuales los campos magnéticos inducen la diferenciación de las células cromafines, se plantearon los siguientes objetivos

GENERALES

1. Investigar si el calcio juega un papel importante en la neurogenización de las células cromafines, producida por estimulación con campos magnéticos.
2. Investigar si los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje están involucrados en el proceso de neurogenización de las células cromafines inducido por estimulación con campo magnético.

ESPECÍFICOS

- 1.1 Investigar si en ausencia de Ca^{2+} extracelular, la estimulación con CM es capaz de producir diferenciación morfológica en las células cromafines.
- 2.1 Investigar si el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L, afecta la neurogenización de las células cromafines provocada por estimulación con campo magnético.
- 2.3 Investigar si el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo N, afecta la neurogenización de las células cromafines provocada por estimulación con campo magnético.

HIPOTESIS

En este trabajo se propone que la estimulación con CM involucra el movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana para producir la diferenciación celular de las células cromafines hacia un fenotipo neuronal.

1. El bloqueo de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje inhibirá la neurogenización producida por la estimulación con CM.
2. La estimulación de la entrada de Ca^{2+} aumentará la diferenciación de las células cromafines.

METODOS

Cultivo de células cromafines

Se prepararon cultivos de células cromafines disociadas tal como se ha descrito anteriormente (Pacheco-Cano y cols, 1990). Brevemente, se obtuvieron glándulas suprarrenales de ratas Wistar de los días 1- a 3 postnatales (D1-D3). La médula adrenal fue colectada y la disociación del tejido se llevó a cabo en collagenasa (2 mg/ml) (Worthington, tipo I) en una solución salina Spinner libre de Ca^{2+} más desoxirribonucleasa I (DNAasa)(Sigma, tipo II) (15 g/ml) durante 45 min. a 37° C con ligera agitación constante. El tejido fue dispersado mecánicamente y la suspensión celular fue centrifugada a 100g, 20°C durante 10 min. Las células fueron sembradas en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM, Gibco), suplementado con 10% de suero de bovino fetal (Gibco), 4.5 g/ml de insulina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Sigma), 100 g/ml de streptomina (Sigma), y 2.5 g/ml de fungizona (Gibco). La viabilidad celular después de este procedimiento, determinada por el método de exclusión de azul de tripano, fue del 90%. Las células cromafines fueron sembradas en cajas Costar de 24 pozos (pozos de 16 mm) a una densidad de 250,000 células/pozo para los análisis morfológicos y de 300,000 células/pozo para los experimentos de liberación. El NGF (50 ng/ml) (Sigma) fue añadido a la mitad de los pozos de cultivo, mientras que la otra mitad sirvió como control de la neurogenización espontánea. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 7 días en atmósfera húmeda 5% CO_2 -95% O_2 a 37°C y el medio de cultivo fue cambiado cada 72 horas.

Las dihidropiridinas Nifedipina (Sigma) y (-)Bay K 8644 fueron disueltas en DMEM más 60% de etanol. Debido a que las dihidropiridinas son sensibles a la luz, fueron mantenidas en botellas opacas y administradas en oscuridad, 24 horas después del sembrado celular. La ω -conotoxina GVIA (RBI) fue disuelta en agua estéril. Se obtuvieron curvas dosis respuesta de sobrevida con diluciones seriales de las soluciones filtradas. La concentración máxima de etanol en el caso de las dihidropiridinas fue por pozo 0.4%, la cual no afecta la sobrevida de las células cromafines. lo cual fue confirmado aplicar esta concentración de etanol en pozos que sirvieron como testigo.. El medio fue reemplazado por medio fresco cada 48 horas. Las células fueron cultivadas en presencia de los diferentes fármacos durante seis días. Las concentraciones finales fueron para cada fármaco: nifedipina 0.1 μM y 0.3 μM ; ω -conotoxina 0.5 μM y 1 μM ; Bay K 8644 5 μM .

Para los experimentos sin Ca^{2+} extracelular, se utilizó DMEM sin Ca^{2+} (GIBCO), el cual fue suplementado con 10% de suero de bovino fetal, insulina, antibióticos y antimicóticos en las concentraciones ya mencionadas.

Exposición de las células cromafines al campo magnético

Las células cromafines cultivadas en presencia o en ausencia de NGF, con o sin nifedipina, ω -conotoxina o Bay K 8644, fueron expuestas a campos magnéticos de baja frecuencia (60 Hz) como ha sido descrito por Bassen y cols (1992). Las células cultivadas en cajas Costar de 24 pozos fueron colocadas entre dos bobinas de manera que el campo magnético fuera perpendicular a la base de las cajas de cultivo. Bajo estas condiciones, las células fueron expuestas a un campo magnético estático uniforme de 7 G (700 μT), desde el segundo hasta el séptimo día de cultivo. Todos los grupos fueron expuestos al campo magnético por un período de dos horas, dos veces al día.. Las parrillas de acero normalmente usadas en la incubadora fueron sustituidas con parrillas de acrílico para eliminar el calor generado por la exposición al campo magnético.

Inmunocitoquímica

Los cultivos de células cromafines fueron procesados para examinar la presencia de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), usando la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa (Sternberger y cols, 1970). Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, con 0.9% de NaCl (PBS), pH 7.4, durante 30 minutos y permeabilizadas con Triton X-100 al 0.1% más 1% de suero normal de cabra (Vectastain ABC kit, Vector Labs, Inc.) en PBS 0.01, pH 7.4. Las células fueron expuestas

durante 12 horas al anticuerpo de conejo, anti-TH (1:200) (Chemicon). Las células fueron lavadas e incubadas en anti-IgG de conejo hecho en cabra (1:200) por dos horas, lavadas nuevamente y reveladas utilizando el sistema de complejo avidina-biotina, peroxidasa, con diaminobenzidina como cromógeno (Vectastain ABC kit, Vector Labs, Inc.).

Cuantificación de la neurogenización

La cuantificación de la neurogenización producida en células cromafines TH-positivas se realizó con la ayuda del microscopio invertido de contraste de fase bajo el cual se contaron el número total de células que emitían neuritas y cuya longitud fuera mayor o igual al diámetro de una célula. Se contaron 30 campos tomados aleatoriamente por cada pozo de cultivo y los resultados fueron expresados como el porcentaje de células que emiten neuritas con respecto al número total de células en cada pozo. Cada punto individual es el promedio de los valores obtenidos de 30 pozos correspondientes a 10 experimentos diferentes.

Análisis morfométricos

Las células cromafines cultivadas para las mediciones, fueron filmadas con una video cámara adaptada a un microscopio invertido Nikon y almacenadas en formato VHS (JVC VCR). Las imágenes filmadas fueron analizadas fuera de línea con el programa IMAGEN M4, midiendo la longitud de las neuritas de cada una de las células individuales existentes en el campo. Los datos se expresan como la longitud promedio de las neuritas presentes en una célula \pm el EEM, en cada una de las condiciones experimentales.

Liberación de ^3H -Noradrenalina

Los experimentos de liberación de ^3H -Noradrenalina (^3H -NA) fueron realizados esencialmente como fué descrito por Simon y cols (1988, 1989), con algunas modificaciones. Las células cromafines fueron incubadas con 1 Ci/ml [^3H]-noradrenalina (125nM) (12.0 Ci/mmol, Amersham) durante 60 minutos 37°C (Bader y cols, 1986). Las células cultivadas durante siete días en presencia o ausencia de Nifedipina fueron lavadas con solución Locke (NaCl 140 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM, CaCl_2 2.2 mM, glucosa 11 mM, ácido ascórbico 0.546 mM, Hepes 15 mM, pH 7.5) más 10 M de pargilina (Sigma). Posteriormente fueron incubadas por dos períodos de 10 minutos en la misma solución (liberación basal) y estimuladas por 10 minutos con KCl 59 mM (53.1 mM de NaCl sustituido por KCl). Después de la estimulación, las células fueron hidrolizadas por 30 minutos en NaOH 0.4 N y luego diluídas con agua (concentración final 0.16 N de NaOH) y retiradas del fondo del pozo. Se tomaron alícuotas para medir la radioactividad remanente en las células y determinar la cantidad de proteína. La cantidad de ^3H -NA liberada fué calculada como el porcentaje del total de radioactividad presente en las células basado en la cantidad liberada más la cantidad remanente en las células. La liberación provocada por la estimulación con KCl fue calculada utilizando la cantidad de ^3H -NA liberada durante el período de incubación con KCl 59 mM con respecto a la cantidad liberada durante los períodos de liberación basal. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM), y cada punto representa el promedio de los valores obtenidos de 10 experimentos diferentes.

En otro grupo experimentos, se realizó el mismo procedimiento pero se agregó nifedipina 0.3 μM en la solución Locke y en la solución de alto K^+ . De este modo se obtuvo una exposición aguda a nifedipina en el momento de la liberación.

La cantidad de proteína fue medida por el método de Bradford (1976), con albúmina bovina como proteína estándar.

Análisis estadísticos

Las comparaciones entre los tratamientos fueron realizadas mediante pruebas de análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

RESULTADOS

Inmunoquímica y morfología de las células cromafines en cultivo

Las células cromafines de rata cultivadas en presencia o ausencia de NGF durante 7 días mostraron inmunorreacción a TH y una morfología similar a la descrita por otros autores incluyendo la emisión de neuritas (Unsicker y cols, 1985; Notter y cols, 1989; Unsicker y cols, 1978; Unsicker y cols, 1984). Las células cromafines de rata neonatal expuestas a la estimulación con CM de baja frecuencia muestran cambios fenotípicos similares a aquellas expuestas a NGF. La inducción del crecimiento neurítico se observa tanto en células individuales como en los agregados, los cuales también mostraban inmunotinción positiva a TH.

Tanto la exposición de células cromafines en cultivo a NGF como la estimulación magnética de baja frecuencia producen un porcentaje similar de neurogenización el cual es significativamente diferente del obtenido en el grupo control ($F=47.16$, $P < 0.001$). El porcentaje de células neurogenizadas fue 10% en el grupo control; 35% en el grupo tratado con NGF; 30% en el grupo tratado con CM y 32% en el grupo tratado con NGF y CM.

Diferenciación de las células cromafines con nifedipina y ω -conotoxina

Cuando las células cromafines fueron cultivadas en presencia de nifedipina 0.1 μM o 0.3 μM , no se observaron cambios en el porcentaje de neurogenización con respecto al control. En presencia de NGF más nifedipina 0.1 ó 0.3 μM , las células cromafines mostraron una pequeña disminución en el porcentaje de células neurogenizadas respecto al porcentaje obtenido con NGF solamente. Sin embargo este porcentaje de neurogenización permaneció estadísticamente significativo respecto al control (Fig. 3A).

Al mantener los cultivos celulares en presencia de nifedipina 0.1 μM ó 0.3 μM con estimulación con CM se observó una inhibición del porcentaje de neurogenización. Esta inhibición del porcentaje de neurogenización fué estadísticamente significativa cuando se comparó con el porcentaje producido por la estimulación con CM ($F= 64.03$, $P < 0.001$ vs CM) (Fig. 3A).

Las células cromafines estimuladas con CM en presencia de NGF mostraron un porcentaje de emisión de neuritas casi idéntico al producido por la simple exposición a NGF. Bajo esta condición, ambas concentraciones de nifedipina no produjeron una inhibición significativa de la neurogenización. El porcentaje de células con neuritas permaneció significativamente diferente al que presenta el grupo control ($F= 76.94$, $P < 0.001$) (Fig 3A).

Con el fin de investigar el posible papel de los canales de calcio tipo N en la neurogenización mediada por CM, utilizamos el bloqueador específico ω -conotoxina GVIA de manera crónica. La toxina empleada a concentraciones de 0.5 μM y 1 μM no produjo ningún efecto en el porcentaje de neurogenización espontáneo ni en el producido por la estimulación con NGF. Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a CM en presencia de la toxina, observamos con ambas concentraciones de ω -conotoxina una inhibición en el porcentaje de neurogenización, aunque esta solamente fué estadísticamente significativa en la concentración de 1 μM ($p < 0.05$ vs CM) (Fig. 3B).

Al cultivar las células cromafines en presencia de ambos bloqueadores de canales de Ca^{2+} (nifedipina 0.3 μM y ω -conotoxina 1 μM) el porcentaje de neurogenización espontáneo no se afectó, pero sí disminuyó significativamente la neurogenización producida por NGF, por CM y por ambos estímulos aplicados simultáneamente (Fig 3C).

Diferenciación de las células cromafines con Bay K 8644

El agonista del canal de calcio tipo L, Bay K 8644 produce por sí mismo un incremento del 58 % en el porcentaje de neurogenización ($F=8.23$, $p < 0.01$). Cuando el NGF o el CM fueron combinados con el Bay K 8644 hubo un incremento adicional del 102% y 107 % respectivamente en el porcentaje de neurogenización ($F=49.6$, $p < 0.001$ y $F=43.3$, $p < 0.001$). De este incremento 72% y 56% respectivamente fueron contribuidos por el NGF o el CM (Fig 3D).

El porcentaje de células neurogenizadas del grupo tratado con NGF + Bay K 8644 aumento un 26,8% respecto al del grupo tratado sólo con NGF. En el caso del grupo tratado con CM + Bay K8644 este aumento de fue de 32,5% con respecto al grupo tratado sólo con CM. De manera interesante, no se observaron diferencias significativas cuando el porcentaje de neurogenización del NGF fué comparado con el del NGF + Bay K8644. La misma comparación en el caso del CM sí mostró diferencias significativas entre ambas condiciones ($F=4.19$, $p<0.01$). Esto muestra que el Bay K8644 potencia el efecto del CM pero no el del NGF.

Cuando el NGF y el CM fueron aplicados simultáneamente con o sin Bay K8644, no se observaron diferencias significativas entre grupos. Sin embargo, se observó un pequeño aumento en el porcentaje de neurogenización de estos grupos cuando se les comparó con cada condición por separado.

Análisis de la longitud de las neuritas

La figura 4 ilustra el efecto de los bloqueadores de canales de Ca^{2+} sobre la longitud de las neuritas. En esencia se muestra que individualmente el NGF y el CM o ambos simultáneamente incrementan de manera significativa la longitud de las neuritas ($p<0.001$). Las dos dosis probadas de nifedipina (Fig 4A) mantienen la longitud de las neuritas al nivel del control cuando las células son estimuladas con CM, pero no cuando son estimuladas con NGF. Cuando ambos estímulos son combinados, la nifedipina mantiene la longitud de las neuritas al nivel del control.

En presencia de ω -conotoxina, la longitud de las neuritas producidas por NGF es inhibida, pero permanece significativamente diferente con respecto al control, lo cual no sucede en el caso de las células estimuladas con CM. La aplicación de ω -conotoxina no disminuyó la longitud de las neuritas producidas por la estimulación simultánea de NGF y CM (Fig. 4B)

La figura 4C, muestra que la aplicación simultánea de nifedipina ($0.3 \mu M$) y ω -conotoxina ($1 \mu M$), provocó una disminución de la longitud de las neuritas que emitieron las células estimuladas con NGF, CM o con CM+NGF.

Cuando se estimuló la entrada de calcio a través de los canales de calcio tipo L con Bay K8644, se observó un incremento en la longitud de las neuritas que formadas espontáneamente, con respecto a las formadas en ausencia de Bay K8644. La presencia de Bay K8644 no tuvo ningún efecto en la longitud de las neuritas producidas por NGF, sin embargo sí produjo un aumento en la longitud de las neuritas provocadas por la estimulación con CM o por la aplicación simultánea de CM y NGF (Fig 4D).

Porcentaje de neurogenización en medio con bajo calcio

Para investigar la dependencia de Ca^{2+} extracelular en la neurogenización se realizaron experimentos en medio DMEM sin Ca^{2+} suplementado con 10% de suero de bovino fetal, el cual aporta una concentración aproximada de Ca^{2+} de 240 micromoles en cada litro de medio preparado.

El porcentaje de neurogenización de las células cromafines cultivadas en un medio con bajo Ca^{2+} se mantuvo al nivel de la neurogenización espontánea, es decir alrededor del 10%. Cuando las células fueron cultivadas en medio con bajo Ca^{2+} en presencia de NGF el porcentaje de neurogenización fué aproximadamente 30%, muy similar al obtenido en un medio con Ca^{2+} en presencia de NGF. En las células cromafines cultivadas en bajo Ca^{2+} y estimuladas con CM se observó una disminución del 40% en el porcentaje de neurogenización respecto a las células estimuladas con CM en presencia de Ca^{2+} ($p < 0.01$) (Fig 6)

Liberación de 3H -noradrenalina

Los cambios fenotípicos inducidos por NGF en las células cromafines en cultivo se correlacionan con una mayor proporción de células noradrenérgicas y una menor proporción de células adrenérgicas en el estado diferenciado (Müller y Unsicker, 1986). En estos experimentos comparamos el patrón de liberación de 3H -noradrenalina en las células diferenciadas tanto por NGF como por estimulación con campos magnéticos de baja frecuencia. Asimismo comparamos este con el correspondiente al de las células cultivadas en presencia de nifedipina, con el fin de evaluar si la presencia crónica de nifedipina afecta el

mecanismo de liberación de las células cromafines en cultivo. Adicionalmente probamos si la aplicación aguda de nifedipina en estas células afectaba la liberación de ³H-noradrenalina

En el primer grupo de experimentos no se encontraron diferencias en el patrón de liberación basal entre todos los grupos experimentales. Esta liberación basal se mantuvo en un rango de 7-8% del total acumulado (Fig. 7A). En cambio, la despolarización con KCl indujo un aumento significativo en la liberación de ³H-noradrenalina respecto a la liberación basal en todos los grupos (P<0.001). La cantidad de liberación obtenida por la estimulación con KCl fué similar en todas las condiciones experimentales, manteniéndose en un rango del 20% del total acumulado (Fig 7B).

En un segundo grupo de experimentos estudiamos la liberación de ³H-noradrenalina en presencia de 0.3 µM de nifedipina. Encontramos que el porcentaje de liberación basal se mantuvo a niveles muy similares a los de la liberación basal del experimento en el que no se aplicó nifedipina en el medio al momento de la liberación (Fig 7C). Sin embargo, la aplicación aguda de nifedipina inhibió la liberación provocada por el estímulo despolarizante de KCl 59 mM. Tanto en el grupo control como en las células cultivadas en presencia de nifedipina, el estímulo despolarizante no provocó liberación de ³H-noradrenalina. En los grupos cultivados en presencia de NGF y NGF + 0.1 µM de nifedipina, la liberación estimulada fue significativamente mayor a la basal (p<0.05 y p< 0.01 respectivamente). Así mismo, los grupos que crecieron en presencia de CM+NGF con o sin nifedipina, muestran un aumento significativo en el porcentaje de liberación cuando se les estimuló con KCl 59 mM (p<0.05 en el grupo CM+NGF; p<0.01 en CM+NGF+0.3 M de nifedipina y p<0.001 en CM+NGF+0.1 M de nifedipina). En los grupos estimulados con CM el aumento sólo fué significativo cuando las células se cultivaron además en presencia de 0.3 M de nifedipina (p<0.01 vs su basal) (Fig 7D).

La cantidad de proteínas medida al final de los experimentos de liberación no mostró diferencias entre los grupos experimentales, y fue en µg (n=4): células control 65.1 ± 4.3, nifedipina 0.1 µM 66 ± 0, nifedipina 0.3 µM 62.4 ± 2.3, NGF 66.4 ± 4, NGF + nifedipina 0.1µM 71.6 ± 4.6, NGF + nifedipina 0.3 µM 73.4 ± 2.2, CM 71.5 ±2.6, CM+ nifedipina 0.1 µM 62.7 ±1.3, CM + nifedipina 0.3 µM 58.6 ± 2, NGF + CM 68.8 ± 6.7, NGF + CM + nifedipina 0.1 µM 67.5 ± 6.9, NGF + CM + nifedipina 0.3 µM 65.7 ± 1.2.

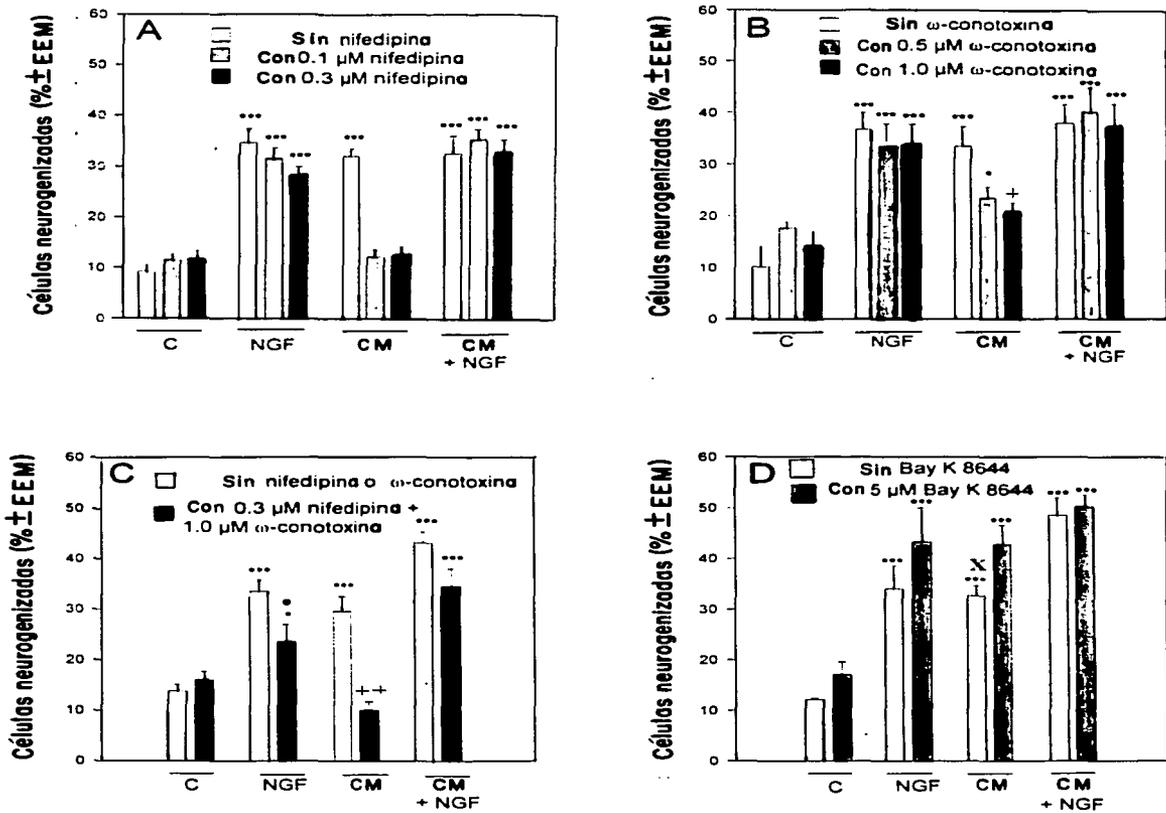


FIGURA 3: Gráfica que ilustra el porcentaje de células cromafines que se diferenciaron hacia un fenotipo neuronal. Se muestra el efecto de los bloqueadores de canales de Ca^{2+} en la neurogénesis inducida por NGF y CM. Las células cromafines fueron cultivadas en presencia o ausencia de NGF o CM durante siete días. En el segundo día de cultivo se añadió nifedipina (0.1 o 0.3 μM) (A), ω -conotoxina (0.5 o 1 μM) (B) o ambas (C). Se realizó una inmunocitoquímica con anticuerpo contra Tirosina Hidroxilasa (TH) y se calculó el porcentaje de las células neurogenizadas del total de células. En (D), se añadió el agonista del canal de Ca^{2+} tipo L Bay K 8644 (5 μM) en presencia o ausencia de NGF o CM. Comparaciones estadísticas * $p < 0.05$ vs C; ** $p < 0.01$ vs C; *** $p < 0.001$ vs C; + $p < 0.01$ vs CM; ++ $p < 0.001$ vs CM; • $p < 0.01$ vs NGF; X $p < 0.01$ vs CM + Bay K8644

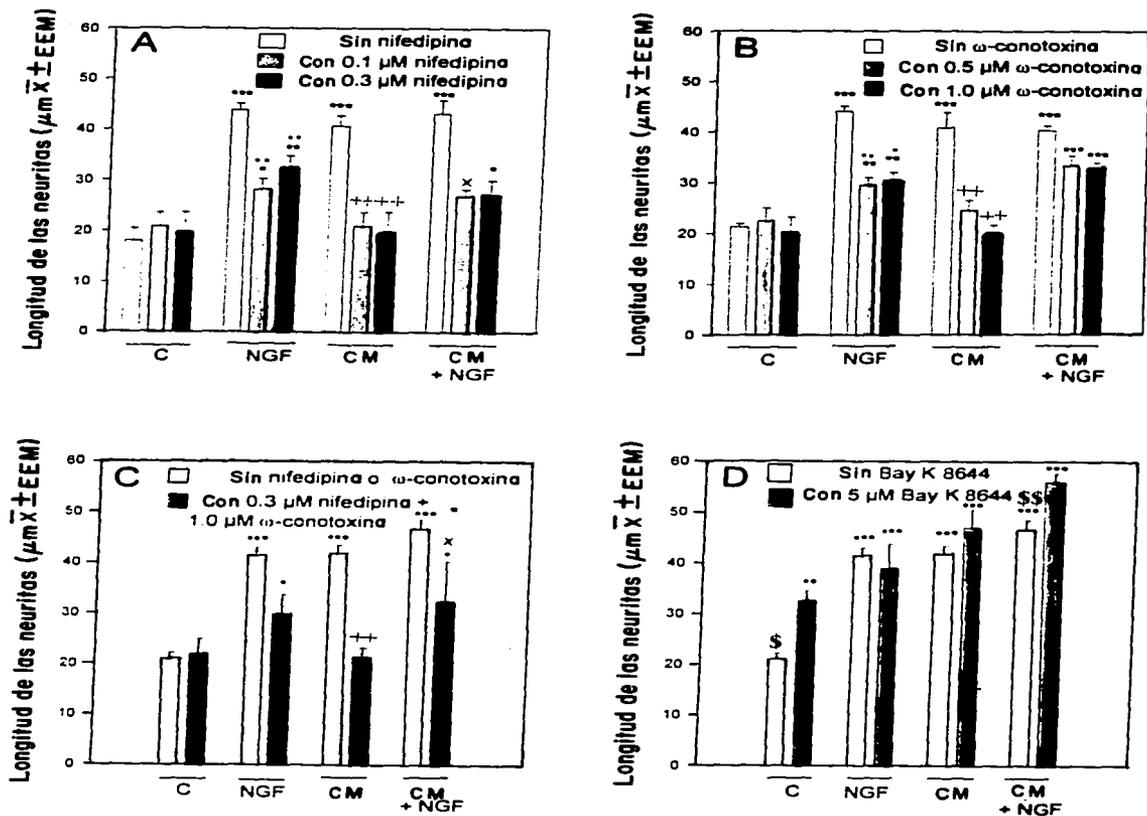


FIGURA 4: Gráfica que ilustra la longitud de las neuritas en las células diferenciadas. Se muestra el efecto de las toxinas bloqueadoras de canales de Ca^{2+} en la longitud de las neuritas de las células cromafines cultivadas. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de NGF o CM y nifedipina (A), ω -conotoxina (B) o ambas (C). (D) ilustra el efecto del Bay K 8644 (5 μ M) en la longitud de las neuritas. Este agonista de canales de Ca^{2+} tipo L potencia la longitud de las neuritas en todos los grupos. Las células fueron inmunoteñidas con Anti-TH y medidas como se describe en los métodos. Las comparaciones estadísticas fueron hechas respecto al control. Comparaciones estadísticas: ** $p < 0.01$ vs C; *** $p < 0.001$ vs C; • $p < 0.01$ vs NGF; •• $p < 0.001$ vs NGF; ++ $p < 0.001$ vs CM; X $p < 0.01$ vs CM; \$ $p < 0.001$ vs Bay K8644; \$\$ $p < 0.01$ vs CM + NGF + Bay K8644

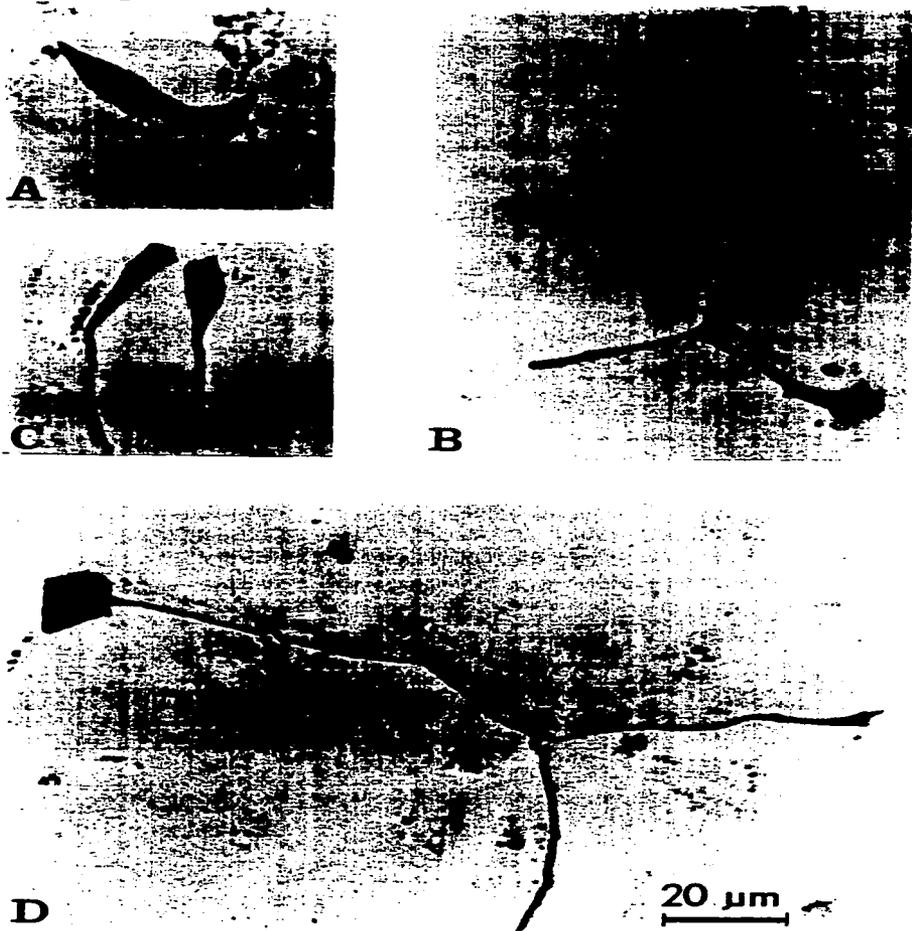


FIGURA 5: Fotomicrografías de células diferenciadas inmunoreactivas a TH con estimulación por CM. (A) antes de la estimulación, (B) estimuladas con CM durante siete días, (C) como en B pero cultivadas con 0.3 μ M de nifedipina, (D) como en B pero cultivadas con 5 μ M de Bay K 8644. Obsérvense los cambios en la longitud de las neuritas.

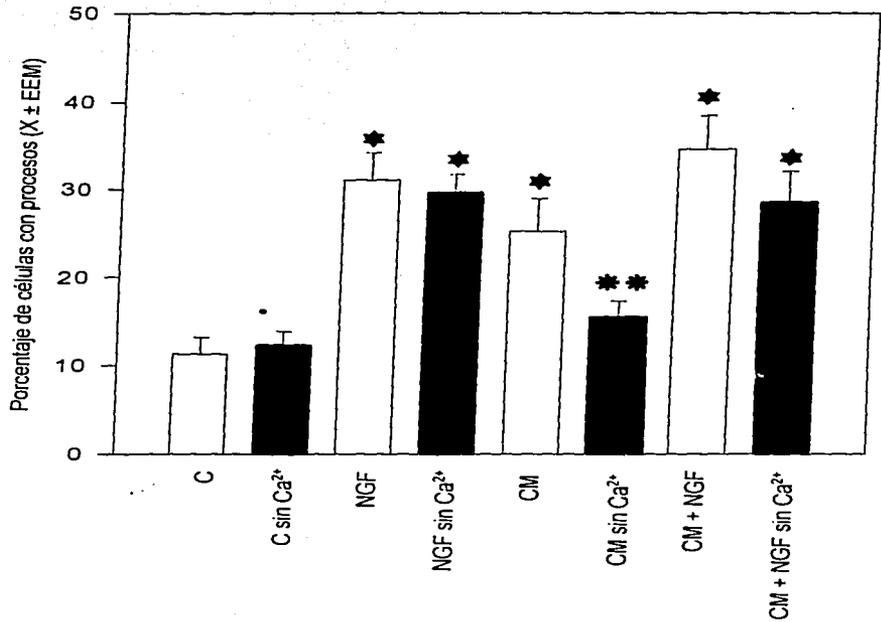
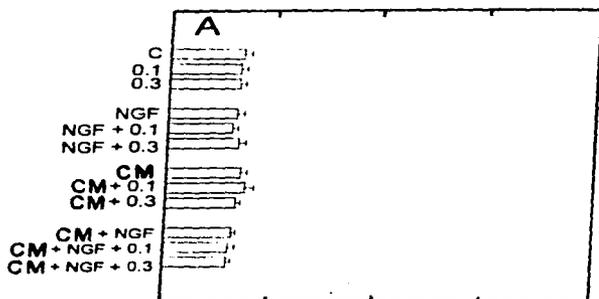
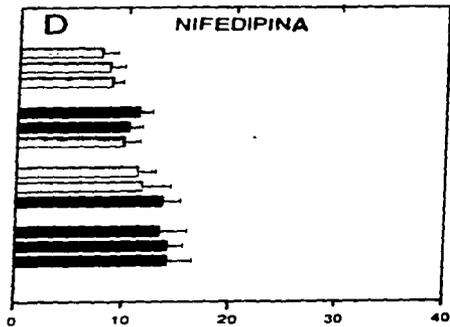
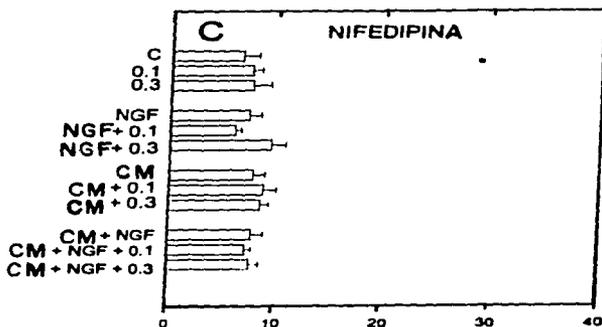
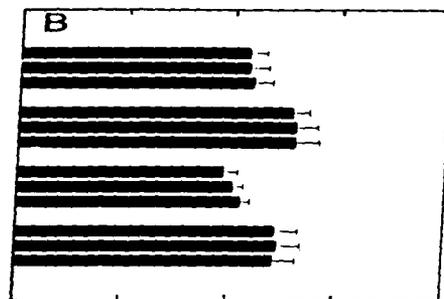


FIGURA 6: Gráfica que muestra el porcentaje de células cromafines que adquiere un fenotipo neuronal en medio con bajo Ca²⁺. Las células cromafines se mantuvieron en cultivo en un medio sin Ca²⁺ suplementado con 10% de suero de bovino fetal. Las células fueron inmunotefidas con anticuerpo anti-TH y cuantificadas como en la Fig. 1. * p < 0.001 respecto al control ** p < 0.01 respecto al CM en presencia de Ca²⁺.

LIBERACION BASAL



LIBERACION INDUCIDA POR KCl



[^3H]-noradrenalina liberada (%) \pm EEM)

FIGURA 7: La liberación de ^3H -noradrenalina fue medida en células cromafines cultivadas durante siete días en presencia de nifedipina y NGF o CM. La liberación basal fue obtenida de dos periodos de incubación de 10 minutos cada uno con solución Locke. La liberación inducida por KCl fue obtenida durante un periodo de diez minutos de incubación con KCl 59 mM. El porcentaje de liberación de estos periodos fue calculado de la cantidad total de liberación. (A) Liberación basal en un medio de lavado sin nifedipina. (B) Liberación inducida por KCl como en A. (C) Liberación basal en un medio de lavado que contenía $0.3 \mu\text{M}$ de nifedipina. (D) Liberación inducida en un medio como en C. Las barras negras indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus propios niveles basales.

DISCUSION

Algunos estímulos físicos como la temperatura, la aplicación de un campo eléctrico, las diferentes longitudes de onda o frecuencias de sonido pueden alterar la fisiología de los organismos a distintos niveles.

Existen evidencias experimentales, que demuestran que la aplicación de un CM sobre los sistemas biológicos es capaz de producir diversos efectos. Por ejemplo, la estimulación con CM provoca cambios en el flujo de Ca^{2+} en diversos tipos celulares como linfocitos, células PC12 e islotes pancreáticos.

En los linfocitos, la exposición a CM reduce la recaptura de $^{45}Ca^{2+}$, indicando que el CM puede estar afectando el movimiento de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Conti y cols, 1985). Estos efectos parecen ser dependientes del estado metabólico en que se encuentre la célula y de la intensidad del campo magnético (Walleczek y Budinger, 1992). En linfocitos T normales y leucémicos, la recaptura de calcio se incrementa durante la exposición a CM (Lyle y cols, 1991). Incluso se ha llegado a formular la hipótesis de que las alteraciones en el influjo de este ión podrían ser propagadas a través de una cascada de transducción de señales para alterar la inducción del mRNA de c-MYC (Liburdy y cols, 1993).

Una evidencia indirecta de que el CM produce un influjo de Ca^{2+} , está dada por los experimentos de Dixey y Rein (1982), en los que muestran que durante la aplicación de CM se produce un aumento en la liberación de 3H -noradrenalina (3H -NA) en células PC12.

Por otra parte, en estudios recientes se ha observado que la aplicación de un CM de 60 Hz y 7 G sobre células cromafines cultivadas produce una diferenciación morfológica similar a la obtenida por la aplicación de NGF (Drucker-Colín y cols, 1994).

La estimulación de las células cromafines con NGF, promueve cambios en la expresión de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Takahashi y cols, 1985, Furukawa y cols, 1993), así como un incremento en la recaptura de $^{45}Ca^{2+}$ (Nikodijevic y Guroff, 1991). Las células cromafines tratadas con NGF presentan una mayor densidad de corriente de Na^{+} respecto a las células no tratadas con este factor trófico. Este incremento en la densidad de corriente es progresivo a lo largo del tiempo de tratamiento con NGF (Islas-Suárez y cols, 1994). Efectos similares se observan cuando las células cromafines son expuestas a un CM. Por ejemplo, la aplicación de este estímulo físico produce un aumento en la densidad de corriente de Na^{+} , ligeramente inferior al inducido por la aplicación de NGF. Esto sugiere un posible aumento en la expresión de canales de este ión (Drucker-Colín y cols, 1994). Del mismo modo, la aplicación de CM produce también un incremento en la densidad de corriente de Ca^{2+} en las células cromafines. La densidad de corriente de Ca^{2+} de las células tratadas con CM es mayor que la de las células en condiciones control, pero ligeramente menor a la densidad de corriente de las células tratadas con NGF. Además en las células tratadas con NGF o con CM el componente de la corriente sensible a dihidropiridinas es mayor que en las células control, lo que sugiere una mayor expresión de canales de Ca^{2+} tipo L (Morgado y cols, en prensa; ver manuscrito anexo).

Todos estos datos indican que el CM, no sólo promueve diferenciación de las células cromafines a nivel morfológico, sino que muy posiblemente la diferenciación incluye cambios en la actividad y/o expresión de los diferentes canales iónicos.

Con el propósito de conocer cuales son los mecanismos por los cuales el CM induce la diferenciación neuronal, en este trabajo se realizaron manipulaciones farmacológicas de los canales de Ca^{2+} tipo L y N con el fin de observar su papel en este proceso.

Bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo L y N

En presencia de NGF, el tratamiento crónico de nifedipina no produce ningún efecto sobre el porcentaje de neurogenización. Este dato sugiere que la neurogenización producida por el NGF posiblemente no requiere influjo de Ca^{2+} a través de los canales tipo L. Si bien se sabe que el tratamiento crónico con NGF produce un aumento de la corriente de Ca^{2+} en las células cromafines y PC12, no se tiene claro si este incremento es causa o consecuencia del proceso de neurogenización.

Algunos autores proponen que la aplicación aguda de nifedipina provoca una entrada de Ca^{2+} , que aumenta la concentración citoplasmática de este ión para desencadenar la neurogenización de las células (Pandiella-Alonso y cols, 1986; Nikodijevic y Guroff, 1991). La entrada de Ca^{2+} podría ser a través de los

canales sensibles a voltaje, especialmente los tipo L (Rogers y Hendry, 1990), o debida a una liberación Ca^{2+} de las pozas intracelulares dependiente de Ca^{2+} extracelular (Contreras y Guroff, 1987), o independiente de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Yamashita y Kawana, 1991). Sin embargo existen algunas evidencias que no apoyan esta teoría. Landreth y cols (1980), no encontraron ningún efecto de la aplicación aguda de NGF sobre los flujos de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Streit y Lux (1987), no observaron ninguna alteración de las corrientes de Ca^{2+} provocada por la aplicación aguda de NGF que pudiera apoyar que las corrientes de Ca^{2+} tienen un papel activo en la neurogenización inducida por NGF. Estos autores observaron que el NGF produce en las células PC12 un incremento en la corriente de Ca^{2+} sólo después de tres días de tratamiento, una vez que los cambios morfológicos son evidentes. Después de la aplicación de NGF y durante los dos primeros días de tratamiento no pudieron observar ninguna alteración en la corriente de este ión, lo que sugiere que, por lo menos el inicio de la neurogenización mediada por NGF no requiere alteraciones en los flujos membranales de Ca^{2+} y que este factor trófico no actúa a través de este mecanismo.

Por otro lado, la aplicación de nifedipina, un bloqueador orgánico de canales de Ca^{2+} tipo L, en el medio de cultivo, produce una inhibición significativa del crecimiento neurítico provocado por la estimulación con CM. Este resultado indica que en las células cromafines estimuladas con CM, el flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L es necesario para inducir las respuestas celulares que promueven la formación de neuritas. Actualmente se ha demostrado que los canales de Ca^{2+} juegan un papel importante en el proceso de neurogenización no mediada por factores tróficos. Por ejemplo, la emisión de neuritas de las células PC12 provocada por la aplicación de anticuerpos contra Thy-1 requiere ingreso de Ca^{2+} a través de los canales tipo L y N (Doherty y cols, 1993). En neuronas ganglionares privadas de NGF se ha observado la importancia de los canales de Ca^{2+} tipo L para la sobrepolarización mediada por despolarización con KCl (Koike y Tanaka, 1991; Eichery cols, 1992; Tanaka y Koike, 1995).

Sin embargo, actualmente se sabe que en células PC12, la entrada de Ca^{2+} provocada por la despolarización con KCl durante una hora diaria, no es suficiente para inducir neurogenización o un incremento en la corriente de Ca^{2+} . Sin embargo el tratamiento con NGF durante una hora diaria, no sólo produce neurogenización observada a los tres días, sino incrementa la corriente de Ca^{2+} y promueve la transcripción de c-jun y c-fos (Cavalié y cols, 1994). Estos experimentos sugieren que la elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} no es la responsable de la neurogenización mediada por NGF, y cuestionan hasta que punto la despolarización podría inducir neurogenización.

Aunque se requiere otro tipo de experimentos para probar que el CM provoca despolarización en las células cromafines, es claro que este no es el único mecanismo a través del cual el CM promueve la neurogenización. Posiblemente el CM, al ser un estímulo físico no mediado por ningún receptor, actúe de manera inespecífica sobre las células, alterando los flujos de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (Jolley y cols, 1983), o la expresión de genes (Liburdy y cols, 1993; Desjobert y cols, 1995).

Por otra parte, el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo N con ω -conotoxina produce a altas concentraciones (1 μM) inhibición de la neurogenización mediada por CM. Nuevamente, esta toxina no altera el porcentaje de neurogenización producido por NGF, lo que sugiere que este tipo de canales no es relevante en el proceso de neurogenización. No se tiene una idea clara del papel de estos canales en la diferenciación mediada por NGF. Takahashi y cols (1985) mencionan que durante el proceso de diferenciación de las células PC12, se expresan gradualmente canales de Ca^{2+} insensibles a dihidropiridinas y sensibles a ω -conotoxina. Sin embargo Streit y Lux (1990), se muestran en contra de esta posibilidad, diciendo que el aumento en la corriente de Ca^{2+} es debida a un aumento en la expresión de canales tipo L, más que a la síntesis de canales tipo N.

En el presente trabajo, la aplicación simultánea de nifedipina y ω -conotoxina, inhibe la neurogenización producida por el CM y produce una disminución no significativa en aquella producida por NGF. Probablemente el NGF, promueva la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares, y requiera un ligero flujo de Ca^{2+} inicial a través de canales de calcio tipo L o N indistintamente, por lo que el bloqueo simultáneo de ambos canales produce esta disminución en la neurogenización.

Es interesante observar que en las células cromafines el bloqueo de los canales de calcio tipo L y de los L y N simultáneamente inhibe la neurogenización provocada por la estimulación magnética, permaneciendo inalterados los niveles de neurogenización espontánea. Esto nos obliga a cuestionarnos cual mecanismo produce esta neurogenización espontánea. Aparentemente este mecanismo sería independiente del flujo de Ca^{2+} . Sin embargo, es posible que las células que se neurogenizan espontáneamente sean aquellas que durante el proceso de disociación estuvieron momentáneamente más permeables al Ca^{2+} , quizá

debido a la manipulación (Verdugo-Díaz y cols, 1995). También cabe la posibilidad de que estas células adquieran un fenotipo neuronal debido a un programa intrínseco de neurogenización independiente de cualquier manipulación. Es importante recordar que *in vivo* las células cromafines están expuestas a normalmente a altas concentraciones de glucocorticoides, los cuales son responsables de la inhibición de la neurogenización de estas células. En cultivo, las células cromafines se encuentran aisladas de la corteza adrenal y por lo tanto privadas de glucocorticoides. Posiblemente las células que se neurogenizan espontáneamente sean aquellas más sensibles a la privación de glucocorticoides.

Estimulación del canal de Ca²⁺ tipo L

La aplicación del agonista de canales de Ca²⁺ tipo L (-)Bay K 8644 a las células cromafines produjo un ligero aumento en el porcentaje de neurogenización, el cual sólo fue estadísticamente significativo en las células estimuladas con CM. En neuronas simpáticas, Rogers y Hendry (1990) observaron que al aplicar este agonista se produce una potenciación de aproximadamente 40% en el crecimiento neurítico estimulado por NGF. Estas evidencias sugieren que la actividad de este tipo de canal de calcio está directamente relacionada con la neurogenización mediada por CM, mientras que en el caso del NGF, el mecanismo no es totalmente dependiente de la actividad de este canal. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, es probable que la neurogenización mediada por CM, no se deba solamente a la entrada de Ca²⁺ a través de los canales tipo L, sino a un efecto inespecífico del CM que esté activando otras vías de señalización intracelular.

Longitud de los procesos neuríticos

El bloqueo de canales de Ca²⁺ tipo L y N, produce una disminución significativa de la longitud de los procesos neuríticos emitidos tanto en presencia de NGF como durante la estimulación con CM, lo que pone de manifiesto que el Ca²⁺ puede ser necesario no tanto para desencadenar la emisión de neuritas sino para determinar la longitud de estas (Streit y Lux, 1989). Se sabe que los conos de crecimiento en proceso de elongación poseen una concentración de 100 a 300 nM de Ca²⁺ intracelular, mientras que los conos que no están creciendo la tienen en el rango de 40-80 nM (Revisado por Kater y cols, 1988). También se ha observado que durante el proceso de diferenciación ocurren espontáneamente aumentos transitorios de Ca²⁺, los cuales son dependientes de la liberación de Ca²⁺ de las pozas intracelulares. Esta liberación de Ca²⁺ es inducida por influjo de Ca²⁺ a través de los canales dependientes de voltaje (Holliday y cols, 1991). Esto podría explicar la menor longitud de los procesos neuríticos provocada por el bloqueo de los canales de Ca²⁺ tipo L y/o N.

Neurogenización en medio con baja concentración de Ca²⁺

Con el objeto de estudiar el efecto de una disminución de la concentración de Ca²⁺ extracelular sobre la neurogenización inducida por CM, las células cromafines fueron sembradas en un medio sin Ca²⁺ (sólo el aportado como contaminante en el suero de bovino fetal). En estas condiciones únicamente la neurogenización inducida por CM fue inhibida. Esto sugiere que el movimiento de Ca²⁺ extracelular es importante para la inducción del cambio morfológico de las células tratadas con CM.

Por otra parte, en las mismas condiciones la neurogenización de las células tratadas con NGF no fue afectada. Algunos autores han demostrado que la aplicación de NGF eleva la concentración de Ca²⁺ intracelular lo cual es resultado de la rápida acumulación de IP₃ que a su vez induce la liberación de Ca²⁺ de las pozas intracelulares (Pandiella-Alonso y cols, 1986; Contreras y Guroff, 1987). Es probable que esta fuente de Ca²⁺ sea utilizada para desencadenar el proceso de neurogenización inducido por NGF y por lo tanto no le afecte la baja concentración de Ca²⁺ extracelular. Esta idea se ve apoyada por los estudios de Yamashita y Kawana (1991) quienes observaron que al infundir NGF cerca del cuerpo celular de neuronas ganglionares existe un incremento transitorio de la concentración de Ca²⁺ intracelular y que, al eliminar el Ca²⁺ extracelular e infundir nuevamente NGF este incremento de Ca²⁺ citoplasmático permanece.

Estas evidencias apoyan la idea de que en presencia de una [Ca²⁺]_e baja, el NGF es capaz de inducir la liberación de Ca²⁺ de las pozas intracelulares y que este cambio de [Ca²⁺]_i, desencadena las respuestas

celulares encaminadas a producir diferenciación, no así en las células estimuladas con CM en las cuales la neurogenización parece ser dependiente del influjo de Ca^{2+} .

Liberación de 3H -noradrenalina

En este trabajo, se realizaron experimentos de liberación de 3H -NA producida por concentraciones despolarizantes de K^+ en células estimuladas durante 7 días con CM. Estos experimentos demostraron que la estimulación con CM no altera el mecanismo de secreción de catecolaminas, ya que los porcentajes de liberación son similares entre los diferentes grupos. La interrogante que surge inmediatamente, es si la estimulación con CM altera los flujos de Ca^{2+} sólo durante el tiempo de exposición o si el efecto persiste aún después de la estimulación.

Cuando se realizaron los mismos experimentos en presencia de nifedipina en el medio de liberación, se pudo observar que el bloqueo del influjo de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L, inhibe totalmente la liberación de 3H -NA en las células cromafines sin tratamiento y en las tratadas sólo con nifedipina. Esta inhibición coincide con el hecho de que las células cromafines en su estado endocrino poseen primordialmente canales de calcio sensibles a dihidropiridinas. Se esperaría que las células con un fenotipo diferenciado mostrarán un porcentaje de liberación más elevado, lo que sucede en los grupos tratados con NGF, NGF + 0.1 μM de nifedipina, CM+NGF, CM+NGF+0.1 μM y CM+NGF+0.3 μM . Sin embargo, contrario a lo que se esperaba, algunos grupos que mostraron diferenciación morfológica no presentaron una liberación superior a la liberación basal, como es el caso de los grupos NGF+ 0.3 μM de nifedipina y CM. El grupo CM+ 0.3 μM de nifedipina presentó una fuerte inhibición de la diferenciación morfológica y sin embargo mostró un porcentaje de liberación estadísticamente mayor al de su basal. Estos hechos sugieren la posibilidad de que aún cuando la diferenciación morfológica sea similar entre los diferentes grupos, posiblemente la expresión de los diferentes tipos farmacológicos de canales de Ca^{2+} no sea igual.

Sobrevida de las células cromafines

Actualmente se sabe que el NGF induce mitosis en células cromafines y actúa como un factor protector de los efectos de la formación de radicales libres (Lillien y Claude, 1985; Perez-Polo y cols, 1990).

En este trabajo la cantidad de células sembradas en cada condición se mantuvo constante, por lo que los cambios en el porcentaje de neurogenización o en la liberación de 3H -noradrenalina no están asociados con una diferencia en la cantidad de células presentes. Una manera indirecta de cuantificar la sobrevida fue a través de la cantidad de proteína presente en cada condición. No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de proteína en las células cultivadas con NGF, CM o sin tratamiento alguno.

En neuronas simpáticas la actividad del canal de calcio tipo L es indispensable para que estas células sobrevivan en presencia de concentraciones despolarizantes de K^+ o de AMP cíclico, cuando no se cuenta con NGF en el medio (Murell y Tolkovsky, 1993).

Posibles mecanismos de entrada de Ca^{2+}

En células endocrinas de la línea celular GH3, Rosen (1996) observó mediante la técnica de patch clamp, que la exposición a un campo magnético de 120 mT produce una ligera reducción en la amplitud del pico de corriente de calcio, además de un cambio significativo en la activación del canal, volviéndose esta más lenta. Todos estos cambios fueron reversibles y parecen ser dependientes de temperatura. Estos resultados parecen ser la consecuencia de un cambio estructural en la porción intramembranal de los canales de Ca^{2+} debida a una deformación de la membrana producida por el campo magnético. Este posible mecanismo está sustentado por los trabajos de Sanders y cols (1990, 1993), quienes encuentran mediante estudios con resonancia magnética nuclear, que al exponer bicapas artificiales de mezclas de fosfolípidos/detergente a campos magnéticos, estas se orientan de manera perpendicular al CM. La capacidad de orientación es dependiente de la cantidad de detergente en la mezcla. En mezclas conteniendo una

proporción 1:5 de detergente: fosfolípido la orientación de la bicapa es tolerante a cambios en temperatura, pH y fuerza iónica, así como a la adición de proteínas solubles. Si las bicapas de fosfolípidos celulares sufrieran esta orientación al ser sometidas al CM, es de esperarse que la estructura y quizá el funcionamiento de las diversas proteínas de membrana se vean afectados.

En observaciones con microscopía electrónica se han detectado cambios en la superficie la membrana celular de células expuestas a CM (Paradisi y cols, 1993), así como alteraciones en la permeabilidad de la membrana a moléculas relativamente grandes como fármacos (Aoki y cols, 1990). Smith y cols, (1991) han detectado que tras la exposición a un CM, la superficie de la membrana celular muestra un incremento en la cantidad de cargas negativas, lo que podría atraer una mayor cantidad de iones positivos como el Ca^{2+} .

Higashi y cols (1993), han observado que los eritrocitos en cultivo expuestos a CM de 1- 8 T, se orientan con el plano cóncavo paralelo a la dirección del CM. Los autores argumentan que esta fenómeno es debido a la orientación de los diferentes materiales diamagnéticos de la membrana de los eritrocitos.

Es importante señalar que existen tres categorías de materiales de acuerdo al comportamiento de sus momentos magnéticos (Serway, 1993). Para definir el concepto de momento magnético se debe tener en mente el modelo clásico del átomo en el cual se supone que los electrones se mueven en una orbita circular alrededor de un núcleo. En este modelo, un electrón orbitando se ve como una espira delgada de corriente. Cualquier espira de corriente tiene un campo magnético y su correspondiente momento magnético (se define momento como el producto de la magnitud de la fuerza y la distancia perpendicular del centro de rotación a la línea de acción de la fuerza). El momento magnético total de un electrón se debe a la combinación de su movimiento orbital y su propiedad intrínseca llamada espín. Las fuerzas mutuas entre estos dipolos magnéticos y sus interacciones con un campo magnético externo son fundamentalmente importantes en el entendimiento de los materiales magnéticos. Los materiales paramagnéticos y ferromagnéticos son aquellos que tienen átomos con momentos magnéticos dipolares permanentes. Los materiales diamagnéticos son aquellos cuyos átomos no tienen momentos magnéticos dipolares permanentes.

El hierro, cobalto, níquel, gadolinio y disprosio son materiales fuertemente magnéticos y suelen llamarse ferromagnéticos. Las sustancias ferromagnéticas se utilizan para la fabricación de imanes permanentes. Tales sustancias contienen momentos magnéticos atómicos que tienden a alinearse paralelamente unos de otros en presencia de un fuerte campo magnético externo. Con los momentos alineados, la sustancia permanecerá magnetizada después de quitar el campo magnético externo.

Las sustancias paramagnéticas también contienen átomos con momentos magnéticos permanentes. Estos dipolos sólo interactúan fuertemente entre ellos y están orientados en forma aleatoria en ausencia de un campo magnético externo. Cuando la sustancia se coloca en un campo magnético externo, sus dipolos atómicos tienden a alinearse con el campo. Sin embargo, este proceso de alineamiento es afectado por los efectos del movimiento térmico, el cual tiende a desorientar los dipolos.

El calcio, al ser un elemento paramagnético podría estar sufriendo las alteraciones producidas por la exposición al campo magnético externo alineándose alrededor de la membrana celular. Esto aunado a una alteración de las propiedades de la membrana, como mayor permeabilidad o una disfunción de los canales, podría propiciar el flujo de Ca^{2+} .

Quizá el CM modifique las características fisicoquímicas del Ca^{2+} , alterando su comportamiento en el medio de cultivo o incluso dentro de la célula. Por ejemplo Ayrapetyan y cols, (1994) han observado que la conductividad eléctrica de soluciones de CaCl_2 se alteran después de estar sometidas a un CM, el cual posiblemente produce cambios en la hidratación del ión Ca^{2+} .

En este trabajo se ha demostrado que la estimulación con CM requiere la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L en las células cromafines para desencadenar los mecanismos celulares necesarios para la neurogenización. Queda ahora por esclarecerse la vía de señalización que sigue este Ca^{2+} para producir estos efectos celulares, y si otras vías de segundos mensajeros se encuentran involucradas. También surge la interrogante de si esta diferenciación morfológica tan parecida a la provocada por el NGF, lo es también a nivel bioquímico y molecular; es decir, si el campo magnético es capaz de producir la activación enzimática y de inducir la expresión génica como lo hace el NGF. Actualmente se sabe que el NGF ejerce sus efectos a través de la activación de diversas enzimas como la cinasa dependiente de inositol trifosfato (IP3 cinasa) o la fosfolipasa $\text{C}_{\alpha 1}$, y que es capaz de inducir la expresión de c-fos y de diversas proteínas como calmodulina y proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), entre otras.

Si bien es cierto que este trabajo propone un primer mecanismo de acción del CM para producir la diferenciación morfológica de las células cromafines, también es cierto que quedan muchas interrogantes por resolver, antes de poder establecer completamente la vía de señalización producida por la estimulación con CM.

REFERENCIAS

- Acheson, A., Naujoks, L. K. and Thoenen, H. (1984) Nerve growth factor-mediated enzyme induction in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells: Specificity and level of regulation. *J. Neurosci.* 4:1771-1780.
- Adey, W. R. (1981) Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields. *Physiological Reviews.* 61(2): 435-514
- Aoki, H., Yamazaki, H., Yoshino, T., Akagi, T. (1990) Effects of static magnetic fields on membrane permeability of a cultured cell line. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 69:103-106
- Ayrapetyan, S. N., Grigorian, K. V., Avanesian, A. S., Stamboltsian, K. V. (1994). Magnetic fields alter electrical properties of solutions and their physiological effects. *Bioelectromagnetics.* 15:133-142.
- Bader, M. F., Thiersé, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G. and Gratzl, M. (1986). Characterization of hormone and protein from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J. Biol. Chem.* 261:5777-5783.
- Bassen, H., Litovitz, T., Penafiel, M. and Meister, R. (1992). ELF in vitro exposure systems for inducing uniform electrical and magnetic fields in cell culture media. *Bioelectromagnetics* 13:183-198.
- Berg, E.E. (1992). Intrinsic healing of a patellar tendon donor site defect after anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin. Orthop.* 278:160-3
- Blackman, C.F; Benane, S.G; House, D.E; Pollock, M.M. (1993) Action of 50 Hz magnetic fields on neurite outgrowth in pheochromocytoma cells. *Bioelectromagnetics.* 14:273-286
- Blank, M., Soo, L. (1992) The threshold for alternating current inhibition of Na-K ATPase. *Bioelectromagnetics.* 13:329-333
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72:248-254.
- Cavalié, A., Bernonger, B., Haas, C.A., García, D.E., Lindholm, D., Lux, H.D. (1994) Constitutive upregulation of calcium channel currents in rat pheochromocytoma cells: role of c-fos and c-jun. *J. Physiol.* 479:11-27
- Cavopoli, A.V., Wamil, A. W., Holcomb, R.R., McLean, M.J. (1995) Measurement and analysis of static magnetic fields that block action potentials in cultured neurons. *Bioelectromagnetics.* 16(3): 197-206
- Connolly, J.L. Green, S.A. Greene, LL. A. (1984) Comparison of rapid changes in surface morphology and coated pit formation of PC12 cells in response to nerve growth factor, epidermal growth factor and dibutyryl cyclic AMP. *J. Cell Biol.* 98:457-465
- Conti, P., Gigante, G.E., Cifone, M.G., Fieschi, C., Reale, M., Angeletti, P.U. (1985) A role for Ca²⁺ in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS Lett.* 181(1):28-32
- Contreras, M.L., Guroff, G. (1987). Calcium-dependent nerve growth factor-stimulated hydrolysis of phosphoinositides in PC12 cells. *J. Neurochem.* 48:1466-1472

- Coulton, L. A., Barker, A.T. (1993). Magnetic fields and intracellular calcium: effects on lymphocytes exposed to conditions for "cyclotron resonance". *Phys. Med. Biol.* 38:347-360
- Desjobert, H., Hillion, J., Adolphe, M., Averlant, G., Nafziger, J. (1995). Effects of 50 Hz magnetic fields on C-myc transcript levels in nonsynchronized and synchronized human cells. *Bioelectromagnetics*. 16(5): 277-283
- Dichter, M.A., Tischler, A.S, Greene, L.A. (1977) Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line. *Nature*. 268:501-504
- Dixey, R., Rein, G. (1982). 3H-noradrenaline release potentiated in a clonal nerve cell line by low-intensity pulsed magnetic fields. *Nature* Vol. 296: 253-256
- Doherty, P., Singh, A., Rimon, G., Bolsover, S.R. and Walsh, F. S. (1993). Thy-1 antibody-triggered neurite outgrowth requires an influx of calcium into via N- and L-type calcium channels. *J. Cell Biol.* 122:181-189.
- Drucker-Colin, R., Verdugo-Díaz, L., Méndez, M., Carrillo-Ruiz, J., Morgado-Valle, C., Hernández-Cruz, A. and 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. *Mol. Cell. Neurosci.* 5:485-498.
- Eichler, M. E., Dubinsky, J. M., Rich, K. M. (1992). Relationship of intracellular calcium to dependence on nerve growth factor in dorsal root ganglion neurons in cell culture. *J. Neurochem.* 58:263-269.
- Eichwald, C., Kaiser, F. (1995). Model for external influences on cellular signal transduction pathways including cytosolic calcium oscillations. *Bioelectromagnetics*. 16:75-85.
- Fisher, I., Richter-Landsberg, C., Safaei, R. (1991) Regulation of microtubule associated protein 2 (MAP2) expression by nerve growth factor in PC12 cells. *Experimental cell research* 194:195-201
- Furukawa, K., Onodera, H; Kogure K; Akaike, N. (1993). Alterations of Ca²⁺ currents and their sensitivities to Ca²⁺ antagonists during application and after deprivation of nerve growth factor. *Neuroscience Letters*. 161:13-16
- Goodman, E.M., Greenebaum, M., Marron, M.T. (1995). Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *Int. Rev. of Cytol.* 158 :279-338
- Greene, L.A., Tischler, A. (1976) Establishment of a nonadrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2424-2428
- Greene, L.A., Shooter, E.M. (1980) The nerve growth factor. *Ann. Rev. Neurosci.* 3:352-402
- Harper, G.P., Pearce, F.L., Vernon, C.A. (1976) Production of nerve growth factor by mouse adrenal medulla. *Nature* 262:252-253
- Higashi, T., Yamagishi, A., Takeuchi, T., Kawaguchi, N., Sagawa, S., Onishi, S., Date, M. (1993). Orientation of erythrocytes in a strong static magnetic field. *Blood* 82:1328-1334
- Holliday, J., Adams, R.J., Sejnowski, T.J., Spitzer, N.C. (1991) Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons. *Neuron* 7:787-796
- Islas-Suárez, L., Gómez-Chavarrín, M., Drucker-Colín, R., Hernández-Cruz, A. (1994) Properties of the sodium current in rat chromaffin cells exposed to nerve growth factor *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 72: 1938-1948

- Johnson, D., Lanaham, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., Chao, M. (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545-554
- Jolley, W.B., Hinshaw, D.B., Knierim, K., Hinshaw, D.B. (1983). Magnetic field effects on calcium efflux and insulin secretion in isolated rabbit islets of Langerhans. *Bioelectromagnetics* 4:103-106
- Kater, S. B., Mattson, M.P., Cohan, C., Connor, J. (1988) Calcium regulation of the neuronal growth cone. *TINS* 11:315-321
- Kavaliers, M., Ossenkopp, K., Tysdale, D. M. (1991). Evidence for the involvement of protein kinase C in the modulation of morphine-induced "analgesia" and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the snail, *Cepaea nemoralis*. *Brain Res.* 554: 65-71
- Koike, T., and S. Tanaka. (1991). Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival in vitro may be determined by level of cytoplasmic free Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9774-9778.
- Korzh-Sleptsova, I.L., Lindstrom, E., Mild, K.H., Berglund, A., Lundgren, E. (1995). Low frequency Mfs increased inositol 1,4,5-trisphosphate levels in the Jurkat cell line. *FEBS Lett.* 359(2-3):151-154
- Landreth, G. E., Shooter, E.M. (1980) Nerve growth factor receptors on PC12: Ligand induced conversion from low- to high-affinity states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4751-4755
- Levi-Montalcini, R. (1987) The Nerve Growth Factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162
- Liburdy, R.P. (1992) Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. *FEBS Lett.* 301(1):53-59
- Liburdy, R.P., Callahan, D.E., Harland, J., Dunham, E., Sloma, T.R., Yaswen, P. (1993). Experimental evidence for 60 Hz magnetic fields operating through the signal transduction cascade. *FEBS Lett.* 334(3):301-308
- Lillien, L. E. and Claude, P. (1985) Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature* 317:632-634.
- Lindstrom, E., Berglund, A., Mild, K.H., Lindstrom, P., Lundgren, E. (1995). CD45 phosphatase in Jurkat cells is necessary for response to applied ELF magnetic fields. *FEBS Lett* 370(1-2): 118-122
- Lindstrom, E., Lindstrom, P., Berglund, A., Lundgren E., Mild, K.H. (1995). Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics.* 16:41-47.
- Luben, R.A., Cain, C.D., Chen, M.C.Y., Rosen, D.M., Adey, W.R. (1982). Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4180-4184
- Lyle, D.B., Wang, X., Ayotte, R.D., Sheppard, A.R., Adey, W.R. (1991) Calcium uptake by leukemic and normal T-lymphocytes exposed to low frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 12:145-156
- McLean, M.J., Holcomb, R.R., Wamil, A.W., Pickett, J.D., Cavopoli, A.B. (1995) Blockade of sensory neuron action potentials by static magnetic field in the 10 mT range. *Bioelectromagnetics* 16(1): 20-32

- Mevissen, M., Kietzmann, M., Loscher, W. (1995) In vivo exposure of rats to a weak alternating magnetic field increases ornithine decarboxylase activity in the mammary gland by a similar extent as the carcinogen DMBA. *Cancer Lett.* 90(2): 207-214
- Michael, G.J., Priestley, J. V. (1996) Expression of trkA and p75 nerve growth factor receptors in the adrenal gland. *NeuroReport* 7:1617-1622
- Miyakoshi, J., Yamagishi, N., Ohtsu, S., Mohri, K., Takebe, H. (1996). Increase in hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutations by exposure to high-density 50-Hz magnetic fields. *Mutat. Res.* 349(1):109-114
- Morandi, M.A., Del Rio, J.A., Caren, R.P., Caren, L.D. (1994). Effects of short term exposure to 60 Hz electromagnetic fields on interleukin 1 and interleukin 6 production by peritoneal exudate cells. *Life Sci.* 54(11): 731-738
- Morgado-Valle, C., Verdugo-Díaz, L, García, D.E., Morales-Orozco, C., Drucker-Colín, R. (1997). The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in chormaffin cell differentiation induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell and Tissue Research.* En prensa
- Müller, T. H. and Unsicker, K. (1986) Nerve growth factor and dexamethasone modulate synthesis and storage of catecholamines in cultured rat adrenal medullary cells: Dependence on postnatal age. *J. Neurochem.* 46:516-524.
- Murell, R. D. and Tolkovsky A. M. (1993) Role of Voltage-gated Ca²⁺ channels and intracellular Ca²⁺ in rat sympathetic neuron survival and function promoted by high K⁺ and cyclic AMP in the presence or absence of NGF. *Eur. J. Neurosci.* 5:1261-1272.
- Nikodijevic, B. y Guroff, G. (1991). Nerve growth factor-induced increase in calcium uptake by PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 28:192-199
- Notter, M. F. D., Hansen, J. T., Okawara, S. and Gash, D. M. (1989). Rodent and primate adrenal medullary cells in vitro: Phenotypic plasticity in response to coculture with C6 glioma cells or NGF. *Exp. Brain Res.* 76:38-46
- Ogawa, M., Ishikawa, T. and Irimajiri, A: (1984) Adrenal chromaffin cells form functional cholinergic synapses in culture. *Nature* 307: 66-68
- Otten, U., Schwab, M., Gagnon, C. and Thoenen, H. (1977). Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine B-hydroxylase by nerve growth factor: Comaparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. *Brain Res.* 133:291-303.
- Pacheco-Cano, M.T., García-Hernández, F., Hiriart, M., Komisaruk, B.R., Drucker-Colín, R. (1990) Dibutyl cAMP stimulates analgesia in rats bearing a ventricular adrenal medulla transplant. *Brain Res.* 531:290-293
- Pandiella-Alonso, A., Malgaroli, A., Vicentini, L.M., Meldolesi, J. (1986) Early rise of cytosolic Ca²⁺ induced by NGF in PC12 and chromaffin cells. *FEBS* 208:48-51
- Paradisi, S., Donelli, G., Santini, M.T., Straface, E., Malorni, W. (1993) A 50 Hz magnetic field induces structural and biophysical changes in membranes. *Bioelectromagnetics* 14:247-255
- Paravicini, U., Stoeckel, K., Thoenen, H. (1975) Biological importance of retrograde axonal transport of nerve growth factor in adrenergic neurons. *Brain Res.* 84:279-291

Perez-Polo, J.R., Foreman, P.J., Jackson, G.R., Shan, D., Tagliatela, G., Thorpe, L.w., Werrbach-Perez, K. (1990) Nerve growth factor and neuronal cell death. En *Molecular Neurobiology*. The Human Press Inc. Pags 57-91

Phillips, J.L., Haggren, W., Thomas, W.J., Ishida-Jones, T., Adey, W.R. (1993) Effect of 72 Hz pulsed magnetic field exposure on ras p21 expression in CCRF-CEM cells. *Cancer Biochem Biophys*. 13(3): 187-193

Rausch, D. M., Lewis, D. L., Barker, J. L. and Eiden, L. E. (1990). Functional expression of dihydropyridine-insensitive calcium channels during PC12 cell differentiation by nerve growth factor (NGF), oncogenic ras, or src Tyrosine kinase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 10:237-255

Rogers, M. and Hendry, I. (1990). Involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels in nerve growth factor-dependent neurite outgrowth by sympathetic neurons. *J. Neurosci. Res.* 26:447-454.

Rosen, A.D. (1996) Inhibition of calcium channel activation in GH3 cells by static magnetic fields. *Biochim Biophys Acta* 1282:149-155

Rusovan, A.; Kanje, M; Mild, K.H.(1992). The stimulatory effect of magnetic fields on regeneration of the rat sciatic nerve is frequency dependent. *Exp. Neurol.* 117(1): 81-4

Saffer, J.D., Thurston, S.J. (1995) Short exposures to 60 Hz magnetic fields do not alter MYC expression in HL60 or Daudi cells. *Radiat. Res.* 144: 18-25

Sanders, C.R., Prestegard, J.H. (1990). Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue. *CHAPSO. Biophys J.* 58:447-460

Sanders, C.R., Schaff, J.E., Prestegard, J.H. (1993). Orientational behavior of phosphatidylcholine bilayers in the presence of aromatic amphiphiles and a magnetic field. *Biophys J.* 64:1069-1080

Sandyk, R. (1992). Magnetic fields in the therapy of parkinsonism. *Intern. J. Neuroscience.* 66:209-235

Scaiano, J.C., Cozens, F.L., Mohtat, N. (1995) Influence of combined AC-DC magnetic fields on free radicals in organized and biological systems. Development of model and application of the radical pair mechanism to radicals in micelles. *Photochem. Photobiol.* 62(5):818-829

Seidl, K., Manthorpe, M., Varon, S., Unsicker, K. (1987) Differential effects of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor on catecholamine storage and catecholamine synthesizing enzymes of cultured rat chromaffin cells. *J. Neurochem.* 49:169-174

Serway, R.A. Física. (1993) Tercera edición. Ed. Mcgraw-Hill México

Simon, J.P., Bader, M. F. and Aunis, D. (1988). Secretion from chromaffin cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1712-1716.

Simon, J.P., Bader, M. F. and Aunis, D. (1989). Effect of secretagogues on chromogranin A synthesis in bovine cultured chromaffin cells. Possible regulation by protein kinase C. *J. Biochem.* 260:915-922.

Snider, W.D., Johnson, E.M. (1989) Neurotrophic molecules. *Ann Neurol.* 26:489-506

Smith, O.M., Goodman, E.M., Greenebaum, B., Tipnis, P. (1991) An increase in the negative surface charge of U937 cells exposed to a pulsed magnetic field. *Bioelectromagnetics* 12:197-202

- Sonnenfeld K. H., Ishii D. N. (1985) Fast and slow nerve growth factor binding sites in human neuroblastoma and rat pheochromocytoma cell lines: Relationship of sites to each other and to neurite formation. *J. Neurosci.* 5:1717-1728
- Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J. and Meyer, H.G. (1970). The unlabeled antibody enzyme method immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of Spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18:315-333.
- Streit, J. and Lux, H. D. (1987). Voltage dependent calcium currents in PC12 cells growth cones and cells during NGF-induced cell growth. *Pflügers Arch* 408:634-641
- Streit, J. and Lux, H. D. (1989). Distribution of calcium currents in sprouting PC12 cells. *J. Neurosci.* 9:4190-4199.
- Streit, J. and Lux, H. D. (1990). Calcium current inactivation during nerve growth factor induced differentiation of PC12 cells. *Pflügers Arch* 416:368-374
- Sutter, A., Riopelle, R. J., Harris-Warrick, R., and Shooter E. M. (1979) Nerve growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 254:5972-5982
- Takahashi, M., Tsukui, H. and Hatanaka, H. (1985). Neuronal differentiation of Ca²⁺ channel by nerve growth factor. *Brain Res.* 341:381-384
- Tischler, A. S., Riseberg, J. C., Hardenbrook, M. A. and Cherington, V. (1993). Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells in vitro. *J. Neurosci.* 13:1533-1542.
- Thompson, J.H. (1995) Cortisol secretion and growth in ewe lambs chronically exposed to electric and magnetic fields of a 60 Hz, 500 kilovolts AC transmission line. *J. Ani .Sci.* 73(11):3274-3280
- Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U. and Thoenen, H. (1978). Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: Impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2242-2246.
- Unsicker, K., Vey, J., Hofmann, H.-D., Müller, T. H. and Wilson, A. J. (1984). C6 glioma cell-conditioned medium induces neurite outgrowth and survival of rat chromaffin cells in vitro: Comparison with effects of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2242-2246.
- Unsicker, K., Skaper, S. D. and Varon, S. (1985). Neurotrophic and neurite-promoting factors: Effects on early postnatal chromaffin cells from rat adrenal medulla. *Dev. Brain Res.* 17:117-129.
- Usovicz, M.M., Porzig, H., Becker, C., Reuter, H. (1990) Differential expression by nerve growth factor of two types of Ca²⁺ channels in rat pheochromocytoma cell lines. *J. Physiol.* 426:95-116
- Verdugo-Díaz, L., Méndez, M., Corkidi, G., Drucker-Colín, R. (1995). Phenotypic changes induced by replating of early post-natal rat chromaffin cells. *Neuroscience Letters* 183:167-170
- Walleczek, J., Budinger, T.F. (1992) Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett.* 314(3):351-355
- Weaver, J. C., Astumian, R.D. (1992) Estimates for ELF effects: Noise-based thresholds and the number of experimental conditions required for empirical searches. *Bioelectromagnetics* 11:119-138

Yamashita, A. and Kawana, A. (1991). Nerve growth factor-induced intracellular calcium ion release in chick dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 128:147-149.

Yost, M.G., y Liburdy, R.P.(1992) Time-varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte. *FEBS Lett.* 296(2):117-122.