

**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS,  
QUÍMICAS Y NATURALES DE ZARAGOZA**

**ACTIVIDAD NEURONAL Y MAGNETOBIOLOGÍA**

*DISCURSO DE INGRESO LEÍDO POR EL ACADÉMICO ELECTO*

**Ilma. Sra. Doña MARÍA JESÚS AZANZA RUIZ**

*EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN SOLEMNE  
CELEBRADO EL DÍA 26 DE ENERO DEL AÑO 2006*

*Y*

*DISCURSO DE CONTESTACIÓN POR EL*

**Excmo. Sr. D. HORACIO MARCO MOLL**

*PRESIDENTE*



ZARAGOZA

2006



**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS,  
QUÍMICAS Y NATURALES DE ZARAGOZA**

**ACTIVIDAD NEURONAL Y MAGNETOBIOLOGÍA**

*DISCURSO DE INGRESO LEÍDO POR EL ACADÉMICO ELECTO*

**Ilma. Sra. Doña MARÍA JESÚS AZANZA RUIZ**

*EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN SOLEMNE  
CELEBRADO EL DÍA 26 DE ENERO DEL AÑO 2006*

*Y*

*DISCURSO DE CONTESTACIÓN POR EL*

**Excmo. Sr. D. HORACIO MARCO MOLL**

*PRESIDENTE*



ZARAGOZA

2006

Depósito legal: Z-¿¿¿¿?????

*Imprime:*

Sdad. Coop. De Artes Gráficas

Librería General

Pedro Cerbuna, 23

50009 Zaragoza

[imprentalg@efor.es](mailto:imprentalg@efor.es)

**ACTIVIDAD NEURONAL Y MAGNETOBIOLOGÍA**

**POR LA**

**Ilma. Sra. Doña MARÍA JESÚS AZANZA RUIZ**



Excelentísimo Sr. Presidente

Ilustrísimos Señoras y Señores Académicos

Señoras y Señores

Constituye para mí un gran honor haber sido nombrada Académica numeraria de esta Ilustre Corporación de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Zaragoza. Quiero expresar en primer lugar mi agradecimiento al Excmo. Sr. Presidente por haberme propuesto y a los Ilmos. Académicos por aceptar mi incorporación.

En el contexto de la sociedad actual, que siente veneración por lo joven, por lo nuevo, por lo último, un acto como éste cobra especial fuerza. La Academia representa una institución tradicional en un contexto en el que la actividad de sus miembros tanto académica como de investigación se realiza con jóvenes y está destinada, en cierta medida, a los jóvenes. Nuestra profesión se desarrolla siempre en línea con el pensamiento último, con la última idea, con la hipótesis más reciente, tratando de aplicar la metodología de “pasado mañana”, siendo, el fundamento de nuestro progreso individual, la discusión razonada en el contraste de ideas. ¡Cómo no sentirnos jóvenes!. Unimos en este acto juventud y tradición porque jóvenes somos en espíritu. ¡Así es nuestra profesión de afortunada!. Cada día, en el aula o en el laboratorio, nos encontramos con nuevos retos para seguir adelante. No hay dos días idénticos. Tradición y modernismo se imbrican íntimamente, sin solución de continuidad, rara en otras profesiones. Nuestro pensamiento, en la medida en que es científico, nos conduce a seguir una línea siempre de “hacer algo nuevo”, lo que supone una gran dosis de originalidad, perspicacia, decisión y el convencimiento y confianza para marcar un nuevo camino a seguir. Me incorporo hoy con el sentimiento del honor que se me hace y con el deseo de aportar a la Academia todo aquello que, humildemente, esté dentro de mis posibilidades poder realizar.

Este es un acto que, a título individual, nos obliga a hacer una introspección. Nos coloca en la posición de preguntarnos ¿Qué trayectoria ha seguido mi vida que me ha conducido hasta aquí?. Y, a medida que desgranamos en nuestro pensamiento tantas vivencias pasadas, nos vemos abocados a expresar nuestro agradecimiento a quienes nos enseñaron, a

quienes nos apoyaron en los momentos bajos, pedir disculpas por los errores cometidos, fundamentalmente, a nuestros seres queridos por tanto tiempo robado. Quiero tener presente hoy aquí especialmente a mi familia, mi reconocimiento por el apoyo y estímulo incondicionales de mi esposo que siempre me ha alentado a seguir adelante. Especial mención a mis hijas que siempre han estado a mi lado, y nos han regalado con su capacidad de decidir sobre su futuro profesional al margen de la presión por la actividad científica que, indudablemente, hemos introducido en sus vidas cotidianas.

Pertenezco a una de las generaciones que iniciamos nuestros estudios en la Universidad Complutense en el inicio de la década de los años 60. Aquella década que, con el devenir de los años sería llamada “divina”, para nosotros, los jóvenes universitarios que la hicimos no fue tan divina, o al menos viviendo mientras transcurría no tuvimos conciencia de su “divinidad”. La distancia elimina aristas y lo que permanece, lo que dejamos que aflore, es no simplemente lo bueno, es siempre lo mejor. Aquellos que éramos jóvenes teníamos, como toda juventud de cualquier época, muchos problemas, todos los problemas del mundo, que no es preciso enumerar exhaustivamente. Escasos recursos económicos, escasas Facultades, prácticamente nulas posibilidades de hacer una Tesis Doctoral, y esto considerando que la Tesis era un concepto cuyo contenido solo conocían las mentes más preclaras entre aquellos universitarios. Entre tanta precariedad hay que reconocer que gozábamos de una afición, una pasión por hacer cosas nuevas ilimitada. Esta capacidad de ilusión por el futuro fue probablemente lo mejor de aquella época, fuimos una generación de idealistas. Vinieron años de prosperidad en los que nos sentimos los impulsores de la nueva Universidad y la nueva Ciencia. Pero, comparando con la situación actual, queda patente que estamos ahora en un declive peligroso y, paradójicamente después de 40 años de esfuerzos, con una vuelta a la Universidad de aquellos años. Un tanto por ciento elevado del profesorado está entrando en la década que conduce a la jubilación, y, además, en términos generales, es bastante notable la distancia en edad entre la mayoría del profesorado y los alumnos. Nos faltan jóvenes a los que formar científicamente para que nos sustituyan. Y, me surgen serias dudas de si esta sociedad actual, en la que de forma tan profunda han cambiado los valores fundamentales, es capaz de potenciar las vocaciones científicas entre nuestros alumnos.

Pertenecí a una generación que tuvo que recorrer la geografía española antes de echar el ancla: Universidades Complutense, de Navarra, Granada, Málaga y Zaragoza. Fuimos una generación que se formó en la Ciencia a base de un gran sacrificio personal. Nuestros recuerdos son de un gran esfuerzo, esfuerzo repleto de vivencias que, no obstante, forman voluntades.



El azar configuró mi tactismo positivo hacia las Facultades de Medicina, en Navarra y Zaragoza, incluso en mi estancia en la Universidad de Southampton el Departamento de Fisiología y Bioquímica, que impartía los estudios de la Licenciatura del mismo nombre, estaba ubicado en la Facultad de Medicina. Recuerdo con cariño y agradecimiento al Prof. Dr. Fernando Reinoso Suárez y a todo su equipo de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra con quienes me inicié en la investigación realizando mi Tesis Doctoral en el campo de la Neurofisiología. El Prof. Gerald A. Kerkut, procedente de la Universidad de Cambridge, formado con aquellos que establecieron los cimientos de la moderna neurociencia, me transmitió los conocimientos básicos de la investigación en Neurofisiología molecular. Con él surgieron las primeras charlas sobre el interés de investigar sobre los posibles efectos de la exposición de las neuronas a un campo magnético. Tantas amistades aquí y allá, de tantos años, que permanecen en el recuerdo. El Prof. Dr. Julián Sanz Esponera con quien pasé muchas horas aprendiendo microscopía electrónica junto con la Dra. Pilar Garín (ahora en la Universidad de Viena) que, además, me introdujo en las más modernas técnicas histológicas y con quien tengo la fortuna de compartir parte de nuestras vacaciones veraniegas. A mis amigos y colegas del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Facultad de Medicina de Zaragoza, no tengo que recordarles pues les tengo presentes cada día. Quiero aprovechar esta ocasión para, en público, expresarles mi agradecimiento, mi cariño, mi reconocimiento por la ayuda y estímulo que siempre me han proporcionado. Quiero destacar en particular a los Profs. Dr. Arturo Vera Gil y Carmen Pérez Castejón que siempre me prestaron su incondicional apoyo y buenos consejos de amigos. Las Dras. M<sup>a</sup> Teresa Peg, Concepción Junquera y Julia Aisa, siempre han colaborado estrechamente compartiendo alegrías y tribulaciones. Las Dras. M<sup>a</sup> Jesús Pinilla, M<sup>a</sup> José Barral, Pilar Parra, los Drs. Primitivo Contamina y Manuel Lahoz, además de Nives Pes. Todos juntos hemos conseguido crear un magnífico ambiente. Mis colaboradores más recientes R. Pérez Bruzón y Montserrat Raso que se han adaptado con gran armonía a nuestras costumbres. Un recuerdo muy especial a Magdalena y Flor Camuñas que nos alegraban cada día con su magnífico humor y a Carlota Castillo que derrocha paciencia con todos los que le rodeamos. Por último, y no por ello menos importante, especial mención para mis colegas biólogos de otros centros, en particular las Dras. M<sup>a</sup> Luisa Peleato de la Facultad de Ciencias, M<sup>a</sup> Victoria Arruga, M<sup>a</sup> Teresa Muiño y el Dr. José Álvaro Cebrián de la Facultad de Veterinaria y la Dra. M<sup>a</sup> José Gil de la Facultad de Educación.

Para mi discurso de ingreso he escogido el tema titulado “*Neuronas y Magnetobiología*”, que recoge algunos aspectos interesantes de la línea de investigación desarrollada conjuntamente con el Prof. Agustín del Moral, iniciador del Laboratorio de

Magnetismo de Sólidos del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Facultad de Ciencias Físicas y del Instituto de Ciencias de Materiales de Aragón. Esta línea de investigación podemos denominarla genéricamente, “*Efectos biológicos de los campos magnéticos*”. La iniciamos hace 18 años y se ha realizado íntegramente en la Universidad de Zaragoza. Gracias a los conocimientos, tanto experimentales, como teóricos del Prof. Agustín del Moral, y a la infraestructura del Laboratorio de Magnetismo fue posible, en un período de tiempo relativamente corto, establecer la primera técnica experimental de exposición de neuronas a campo magnético estático en el Laboratorio de Magnetobiología de la Facultad de Medicina y desarrollar modelos teóricos de los que más adelante hablaremos. Con el tiempo, se fueron añadiendo sucesivos investigadores con lo que nuestro grupo ha adquirido el carácter de interdisciplinario fundamental para el desarrollo amplio de nuestra línea de investigación. En el campo de la Neurofisiología: Dra. Ana Cristina Calvo, Marek Kowal (Facultad de Ciencias Físicas, Universidad de Cracow), Rodolfo Pérez Bruzón (Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Santiago, Cuba), Ing. Dimitri Lederer (Escuela Superior de Ingenieros Eléctricos, Universidad Católica de Leuven), Dr. Ceferino Maestú (Fundación Humanismo y Ciencia, Madrid), Viviana López (Colombia). En el campo de la Microscopía Electrónica las Dras Concepción Junquera y Carmen Martínez Ciriano. En el campo de la Inmunocitoquímica: Prof. Dra Carmen Pérez Castejón, Dra. Julia Aisa, Monserrat Raso y Nieves Pes, y en el campo de la Morfometría, Prof. Dr. Arturo Vera-Gil y Dr. Manuel Lahoz.

Mi discurso versa sobre el comportamiento de las neuronas frente a campos magnéticos (continuos y alternos) además del desarrollo de modelos físicos que explican la interacción del campo magnético con la membrana plasmática, que es conocido ser el blanco de las interacciones de los campos electromagnéticos con las células. En él se hace una referencia expresa al impacto que están teniendo en la sociedad los resultados de la investigación en biomagnetismo y magnetobiología.

Es mi deseo que los datos, resultados, conclusiones y opiniones personales, que voy a exponer, sirvan para hacer una puesta al día de este tema que cada vez está atrayendo a un mayor número de investigadores (biólogos, físicos, médicos, ingenieros, químicos, matemáticos), y tengan la altura científica que corresponde a esta Academia.

## 1.- ANTECEDENTES: FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LA MAGNETO-BIOLOGÍA.

Una incógnita desafiante para los biólogos ha sido considerar de qué forma el campo magnético terrestre (CMT), junto con las radiaciones electromagnéticas naturales (REM), en el rango de energía de las no ionizantes, pudieron haber sido factores determinantes en la *evolución* de la vida sobre la tierra. Variables físicas ampliamente estudiadas como: temperatura, humedad, presión atmosférica, latitud, altitud, campo gravitatorio, etc. nos han permitido definir el *medio ambiente natural* al que las diferentes especies animales y vegetales se han adaptado. Es cada vez más evidente que tenemos que añadir, además, el CMT (esencialmente estático), las REM no ionizantes en los rangos del visible e infrarrojo, y las microondas de origen extraterrestre (Fig.1). Las reacciones fotosensibles, fotoquímicas, en el rango del visible, se conocieron relativamente pronto. Se consideran como *adaptaciones* al medio ambiente que permitieron el desarrollo de la *fotosíntesis* en vegetales y de la *visión* en animales. También se conocieron relativamente pronto los efectos térmicos, de calentamiento, en el rango del infrarrojo y las microondas, fruto estas últimas, principalmente, del desarrollo tecnológico.

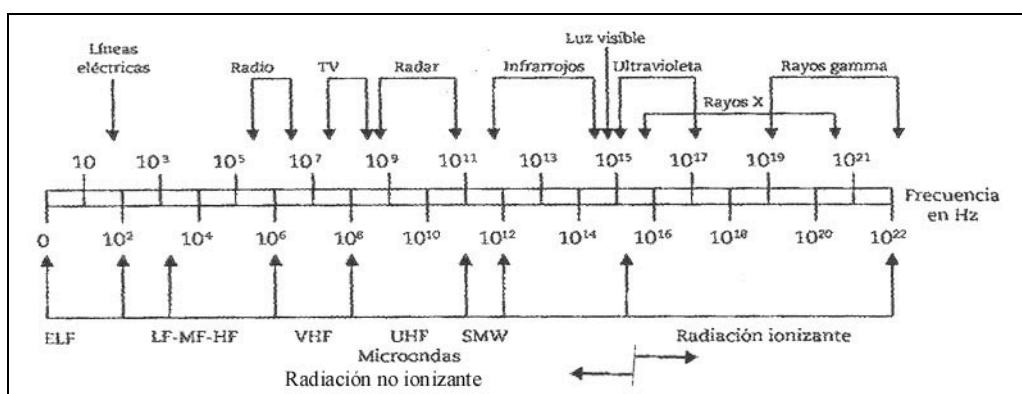


Fig 1.- Espectro completo de las REM conocidas. ELF = frecuencia extremadamente baja; LF = frecuencia baja; MF = frecuencia media; HF = alta frecuencia; VHF = frecuencia muy alta; UHF = frecuencia ultra-alta; MW = microondas. Las radiaciones de frecuencia no ionizante comprenden desde el ultravioleta hasta frecuencia cero (campo magnético estático).

Es bien conocido que la energía de los fotones de las ondas electromagnéticas (EM) es directamente proporcional a su frecuencia (ecuación de Planck,  $E = h \cdot \nu$ ). Sobre esta base, se explicaron los efectos fotosensibles, y los de calentamiento, como el resultado de la transferencia de energía desde las ondas EM a los sistemas biológicos y su correspondiente disipación en los mismos (Fig.2). Era más difícil comprender que el CMT pudiera producir efecto alguno puesto que, siendo su frecuencia cero, la absorción de energía por el sistema vivo, es necesariamente nula. Si, a esta premisa añadimos que los humanos no somos *conscientes* de la presencia del CMT se puede comprender fácilmente que, durante muchos años, se considerara que los organismos vivos no *podían* ser sensibles al mismo. Esta idea puramente intuitiva se extendería fácilmente a los campos electromagnéticos (CEM) de frecuencia extremadamente baja, o de unos pocos Hz (ELF), negándose que pudieran producir efectos biológicos. Es más, aún persiste erróneamente en algunos ambientes científicos el concepto de que no pueden inducirse efectos biológicos en condiciones de exposición que no produzcan calentamiento (efectos atérmicos). Esta postura se sigue defendiendo, incluso, en algunos congresos internacionales contra la fuerte evidencia de los resultados de la experimentación.

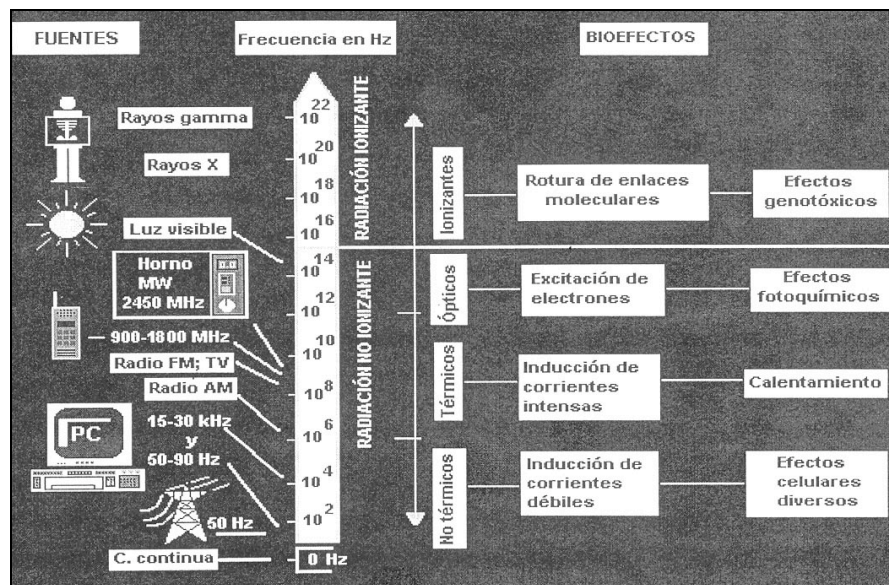


Fig.2.- Las radiaciones electromagnéticas y sus efectos biológicos en función de la frecuencia de las ondas (Úbeda y Trillo, 1999).

Las incógnitas planteadas promovieron una fructífera investigación básica. Desde la década de los años 50 se han descrito efectos biológicos inducidos en el rango de los campos magnéticos estáticos (CME) y de los CEM de ELF (Azanza y del Moral, 1994). La demostración experimental durante décadas de la existencia de efectos biológicos, debería haber despertado la sensibilidad hacia el hecho de ser los “organismos vivos” y sus propiedades, únicos frente a las de la materia inerte.

En el año 1975 Blakemore descubrió las *bacterias magnetotácticas*. Este hecho supuso un hito que modificaría profundamente los conceptos clásicos que se estaban aplicando. Los investigadores expertos en biomagnetismo encontraron eco a sus estudios y, por primera vez en el ámbito científico, apareció un auditorio dispuesto a aceptar nuevas ideas y conceptos hasta entonces ignorados. Estas bacterias son capaces de sintetizar metabólicamente el óxido *magnetita* (una ferrita) que permite su orientación siguiendo las líneas de fuerza del CMT. La demostración experimental de que el CMT, actuando como *agente orientador* (par de fuerzas magnético sobre el momento magnético del nanocrystal de 40-50 nm de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), podía inducir respuestas biológicas era incontestable. La existencia de efectos biológicos de naturaleza *no térmica*, inducidos por CM estáticos y CM de ELF aunque incuestionable sigue siendo objeto de un escrutinio implacable.

Desde sus inicios la investigación sobre los efectos biológicos inducidos por los campos electromagnéticos se mostró compleja. Las variables que se pueden introducir en la experimentación son muchas. Se pueden estudiar los efectos biológicos inducidos por un campo eléctrico (CE) o por un CM separadamente, o bien conjuntamente, aplicando un CEM. Una vez hecha esta elección son numerosas las variables a escoger: la gama de frecuencias a estudiar es muy amplia; la intensidad de campo, H, varía en un amplio rango; la forma de la señal (onda sinusoidal, no sinusoidal y pulsante); el tiempo característico de la señal; el tiempo de aplicación del campo (dosis), etc. El modelo biológico sobre el que realizar los experimentos puede ser asimismo muy diverso: estudios *in vitro* o *in vivo*, en animales de experimentación o en voluntarios humanos. Sin olvidar los estudios epidemiológicos. No se conoce que haya un órgano, una célula *diana*, sobre los que un CEM pueda interaccionar de forma específica. Esto hace que cualquier modelo biológico sea válido para estos estudios. El resultado de todo ello constituye una dificultad a la hora de sistematizar la diversidad de la metodología experimental utilizada y, generalizar los resultados, en uno, o unos pocos, modelos globalizadores.

Los datos experimentales han ido confluyendo hasta definir las *membranas biológicas* (plasmática y de los orgánulos celulares) como una de las *estructuras diana* de la interacción de los CEM de ELF (Adey, 1981; Tenforde, 1986; Schwan, 1986; Barnes, 1990). Se señaló la glándula pineal como un posible *órgano diana* de los CEM, capaz de inducir respuestas biológicas por medio de las variaciones inducidas en la secreción de la hormona melatonina (Semm, 1983; Bardasano, 1986). Los estudios experimentales más consistentes, realizados a una escala subcelular, señalaron a los *iones de calcio* ( $\text{Ca}^{2+}$ ) como los responsables de los efectos inducidos en las células bajo exposición a los CEM de ELF (Bawin, Kaczmarek y Adey, 1975; Bawin y Adey, 1976; Blackman et al., 1982) demostrándose un denominado efecto de *ventana en frecuencia* según el cual las modificaciones en los flujos de calcio se producen solamente para determinados intervalos de frecuencia (alrededor de una central) en el *rango de las ELF*. El desarrollo de la biología celular demostraría, progresivamente, que los iones de calcio, actuando como *segundos mensajeros*, son responsables de la activación de diversos procesos metabólicos en los que diferentes estirpes celulares están especializadas funcionalmente. Se describió la capacidad que posee la membrana para “*amplificar*” las señales biológicas, mediante mecanismos de naturaleza *no lineal*, (es decir, entre el CEM y la respuesta al mismo) lo que permitiría explicar, a su vez, la *amplificación del impacto de los débiles CEM* aplicados, particularmente los de ELF, con la membrana celular (Adey, 1981; Grodsky, 1976; Kaczmarek, 1977). Se establecieron varios modelos físicos tratando de explicar los mecanismos de interacción de los CEM y los CME con las membranas y los efectos inducidos de naturaleza *no térmica* en los sistemas biológicos (Lawrence y Adey, 1982; Blackman et al., 1985; Chiabrera y Bianco, 1987; Liboff y McLeod, 1988; del Moral y Azanza 1992; del Moral et al., 2002; Azanza y del Moral, 1994; Azanza et al., 2002 a).

Se han esquematizado algunos de los efectos observados, como los integrantes de una cadena de interacciones de los CEM con las vías de transducción de las señales biológicas.

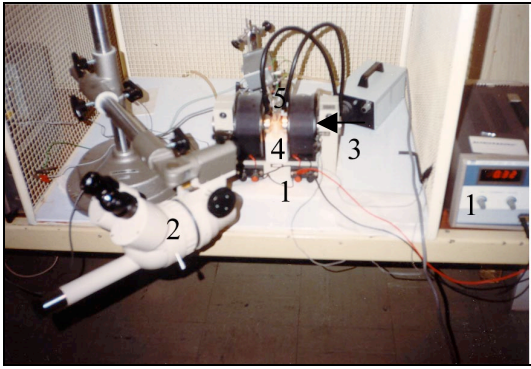
Las variaciones en la concentración citosólica del calcio se destacan como uno de los mecanismos mediadores más importantes de las posibles influencias de los CEM de ELF, su amplificación y expresión en la compleja vía de transducción de las señales biológicas (Tenforde, 1991; Galvanovskis et al., 1999). Las modificaciones en las oscilaciones citosólicas de la concentración del calcio, bajo exposición a un CM de ELF, constituye uno de los aspectos en los que mas se ha avanzado en los últimos años. Los fenómenos oscilatorios juegan un importante papel, tanto en el funcionamiento como en el procesamiento de la

información en los sistemas biológicos. Los fenómenos rítmicos son responsables de la creación, estabilización y mantenimiento de un cierto tipo de orden biológico. La *oscilación de calcio* se produce en períodos de tiempo del rango de 1 segundo a varios minutos. La importancia de esta oscilación queda explicada por el hecho de que el calcio, como segundo mensajero, controla numerosos procesos subcelulares. Para un tipo de célula determinado, el patrón de oscilación puede ser función de la molécula que dispara el proceso y de su concentración relativa, de lo que se infiere que las oscilaciones del calcio intracelular constituyen un sistema biológico *codificado en frecuencia* (Berridge y Galione, 1988).

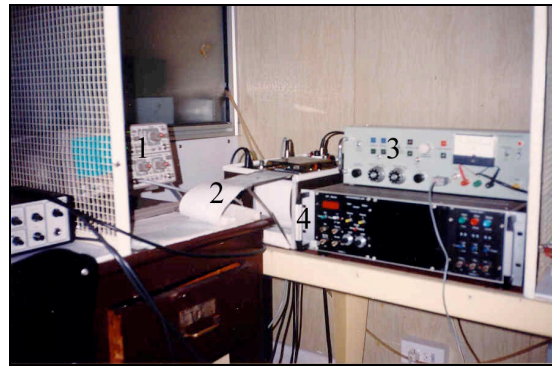
En 1995 se aceptó que “...partiendo de nuestros conocimientos actuales sobre la naturaleza de las respuestas de las moléculas y células a las ondas EM, las células las perciben como cualquier otro cambio sutil en el medio ambiente físico, y responden con una perturbación transitoria de ajuste, de su maquinaria metabólica...” (Goodman et al., 1995). Recientes observaciones han demostrado que los efectos inducidos en determinadas condiciones experimentales bien controladas son reversibles, lo que se ha interpretado como un mecanismo de adaptación de las células (Azanza et al., 2002 b) y los tejidos (Volpe, 2003) a los CEM.

## **2.- EL COMIENZO DE UNA EXPERIENCIA**

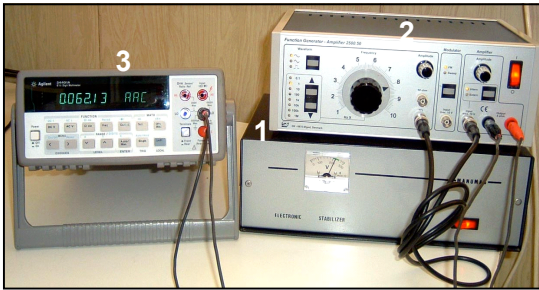
Nuestros estudios, iniciados en el año 1987 en la Universidad de Zaragoza, se han centrado en experimentos diseñados de tal forma que nos permitieran proporcionar una explicación molecular de los efectos biológicos observados, que asimismo permitieran desarrollar un modelo físico que los explicara. En relación con las condiciones de campo nuestro primer objetivo fue determinar el efecto inducido por un CM con el fin de poder discriminarlo del efecto inducido por un campo eléctrico (CE), situación que se daría en el caso de un CEM de frecuencia no muy baja (por ejemplo, kHz). Se escogieron por esta razón campos magnéticos *estáticos* (CME) (Fig.3). El diseño de los experimentos nos ha permitido profundizar en los mecanismos básicos de la interacción del CM con el sistema biológico escogido y poder desarrollar un modelo físico que explica dicha interacción. Una vez establecidos los efectos inducidos por el CM estático iniciamos experimentos aplicando CM alterno, sinusoidal, en un amplio rango de frecuencias ELF e intensidades de campo, siempre en condiciones *no térmicas* de exposición (Fig.8). Para ello la temperatura del baño que mantiene la muestra en solución Ringer específica se controla continuamente durante el experimento.



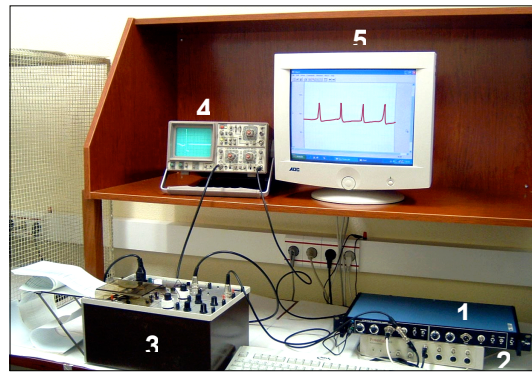
A



B



C



D

Fig.3.- A) Dispositivo experimental dentro de una jaula de Faraday para exposición a campo magnético estático. Los ganglios cerebroideos se disponen en el centro de las piezas polares del electroimán (1), en una cámara de metacrilato transparente, sumergidos en solución Ringer de moluscos (NaCl 80mM, KCl 4mM, CaCl<sub>2</sub> 7mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM y tampón triss-HCL 5mM, pH = 8). Se aplican CM de intensidades en el rango de 1,0 G a 7,2 kG. Componentes: 1) electroimán y fuente de alimentación; 2) lupa binocular; 3) sonda Hall para medir la intensidad de campo magnético aplicado durante el experimento; 4) cámara de metacrilato con la muestra; 5) preamplificador con el microelectrodo. Para el registro del voltaje de membrana se utilizan microelectrodos, consistentes en micropipetas de vidrio, rellenas de solución salina de acetato de potasio, con puntas de diámetro < 0,5  $\mu$ m y resistencia entre 2-20 M $\Omega$ . B) 1) osciloscopio; 2) registrador gráfico; 3) amplificador; 4) equipo de iontoforesis. C) (1) fuente estabilizadora de la corriente; (2) generador de funciones; (3) multímetro digital. D) (1) amplificador; (2) PowerLab para digitalizar las imágenes; (3) registrador gráfico; (4) osciloscopio; (5) ordenador con programa para el control del PowerLab.



Escoger el modelo experimental tanto por lo que se refiere al tipo de muestra biológica, como por lo que se refiere al conjunto de experimentos que se van a llevar a cabo para el reconocimiento funcional, bioquímico o genético del posible efecto inducido, tienen una importancia relevante. El tipo de célula, su estado funcional durante la exposición a los CM estáticos y CEM, la fase del ciclo celular o la especialización funcional son aspectos, entre otros, fundamentales a tener en cuenta para orientar los experimentos correctamente y ser capaces de hacer una interpretación adecuada de los resultados obtenidos.

Para cualquier tipo de célula, los flujos iónicos transmembrana son fundamentales en el mantenimiento de procesos como: homeóstasis iónica, regulación del volumen de agua intracelular, intercambio de metabolitos con el medio extracelular, comunicación intercelular y con el medio ambiente. Sobre la base de un estado de *equilibrio* dinámico para el *sistema* biológico, se han fundamentado procesos fisiológicos que aprovechan *desequilibrios iónicos puntuales* en determinadas condiciones, bajo un exquisito control celular. La génesis de un alto gradiente electroquímico para un ión determinado supone para la célula el *disparo* de una *señal molecular* que provoca el inicio de importantes procesos metabólicos dentro de la célula. Un aumento abrupto en la concentración de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, es decir, la *señal de calcio*, inicia una sucesión de procesos moleculares en cascada. Dependiendo de la especialización celular, puede conducir a respuestas celulares altamente selectivas: secreción de hormonas o neurotransmisores, contracción muscular, producción de potenciales bioeléctricos, inicio de la proliferación celular, biosíntesis o degradación de metabolitos, procesos de endocitosis, etc. Otro ejemplo importante es el elevado gradiente de  $\text{Na}^+$  transmembrana que constituye una fuente de energía que la célula utiliza para incorporar metabolitos, proceso conocido como “*transporte activo secundario*” que no requiere como fuente energética la hidrólisis de ATP. Por último destacar que los gradientes fundamentalmente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  transmembrana, en las neuronas, permiten el desarrollo de los potenciales bioeléctricos, fundamento de la vía más importante de “comunicación intercelular”.

Los flujos de iones producen gradientes eléctricos transmembrana. El movimiento de cargas produce, por lo tanto, un campo eléctrico cuya corriente asociada, genera a su vez un campo magnético. Se ha estimado, por ejemplo, para una célula como un hepatocito, que para un volumen medio de  $5.000 \mu\text{m}^3$ , el área superficial de la membrana es de  $110.000 \mu\text{m}^2$ . Se deduce que los procesos *eléctricos y magnéticos endógenos*, además de *comunes* a todas las

células son cruciales para el mantenimiento de la *vida celular*. Se puede decir que la existencia de campos eléctricos y magnéticos es consustancial con el mantenimiento del estado *vivo*. Estas propiedades eléctricas y magnéticas son extensibles a todo tipo de membranas biológicas, plasmática o membranas de orgánulos celulares (por ejemplo, la envoltura nuclear) y cualquiera que sea el tipo de célula.

Una de las situaciones más evidentes la tenemos, probablemente, en el funcionamiento de las neuronas. En la Figura 4 se representa esquemáticamente una dendrita con tres sinapsis excitadoras A, B y C, una sinapsis inhibitoria D y una sinapsis inactiva E (los contactos sinápticos C y E se establecen en espinas dendríticas). En los contactos sinápticos A, B y C, se liberan neurotransmisores estimuladores. Estos neurotransmisores interactúan con sus receptores específicos, situados en la membrana de la dendrita, y activan canales de  $\text{Na}^+$ . Estos iones se desplazan desde el medio extracelular hacia el interior de la dendrita, siguiendo sus gradientes electroquímicos (de Nernst), y, como son cargas eléctricas móviles, constituyen corrientes eléctricas, de intensidad  $I_{\text{Na}}$  (representadas por los haces de líneas delgadas, de trazado continuo y terminadas en punta de flecha). Estas corrientes eléctricas se distribuyen en el seno del citoplasma (muy rico en iones), quedando confinadas al medio intracelular debido a las propiedades aislantes (alta resistividad) de la membrana plasmática (alto contenido en lípidos). Estas corrientes eléctricas inducen campos magnéticos perpendiculares (flechas circulares, anchas, destacadas en negrita). Simultáneamente, la entrada de iones de  $\text{Na}^+$  produce una modificación del voltaje,  $V_m$  ( $V_m = g_{\text{Na}} + I_{\text{Na}}$ , donde  $g_{\text{Na}}$  es la conductancia de membrana para el  $\text{Na}^+$ ), a través de la membrana que activa los canales de  $\text{Na}^+$ , dependientes de voltaje, produciéndose una diferencia de potencial bioeléctrico en la membrana (corriente de despolarización). La difusión de los iones de  $\text{Na}^+$ , a lo largo de la membrana, produce a su vez una corriente eléctrica que genera un nuevo campo magnético (representado por flechas circulares anchas, en blanco, que rodean toda la sección de la dendrita). Mientras que el campo eléctrico queda confinado en la membrana y las corrientes eléctricas quedan confinadas dentro de la célula, el campo magnético es capaz de atravesar libremente todas las estructuras biológicas, ya que son totalmente permeables al campo magnético. La materia orgánica no perturba los campos magnéticos debido a que las células y los tejidos son débilmente diamagnéticos. La baja susceptibilidad diamagnética,  $\chi$ , con permeabilidad magnética  $\mu = \mu_0 (1 + \chi)$ , muy próxima a la del vacío,  $\mu_0$ , hace que las estructuras resulten permeables a los campos magnéticos, al conservarse la intensidad del campo,  $\vec{H}$ , al atravesar cualquier interfase biológica. El campo magnético prácticamente no

se perturba por los sistemas biológicos, los atraviesa prácticamente sin modificar su intensidad. En contraposición, la intensidad de campo eléctrico,  $\vec{E}$ , disminuye fuertemente al penetrar en un sistema biológico, debido a su elevada constante dieléctrica,  $\epsilon \approx 80$ . Por esta razón, se ha considerado que los CM tienen más posibilidades de inducir efectos en los organismos vivos que los CE.

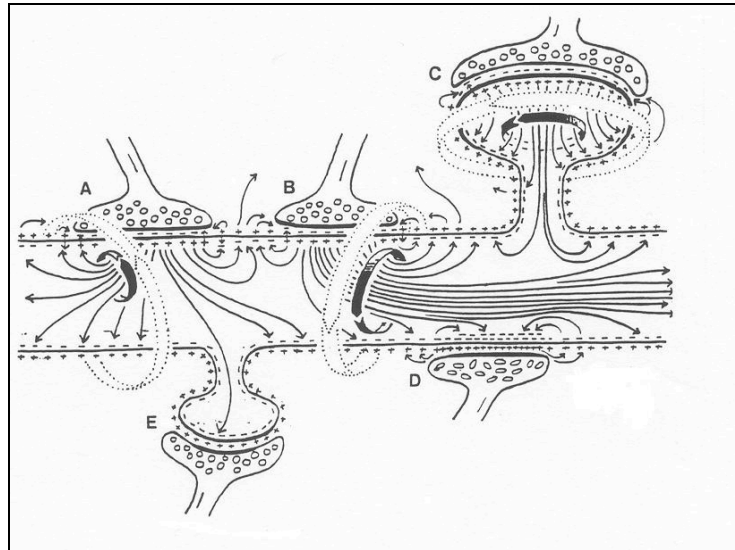


Fig.4.- Producción de un campo magnético *intrínseco* celular. La actividad bioeléctrica de las neuronas produce corrientes eléctricas transmembrana (flechas finas de trazado continuo) que, a su vez, inducen campos magnéticos perpendiculares (líneas de fuerza representadas como flechas anchas, claras y discontinuas y flechas anchas en negrita) (modificado de Romijn, 1997).

Las neuronas, junto con los receptores sensoriales y las fibras musculares, como células excitables, se han especializado en la producción de potenciales de acción que se propagan por toda la superficie de su membrana plasmática, constituyendo así, este proceso, un mecanismo de comunicación intercelular. La base ultraestructural que permite esta conducta radica en un amplio conjunto de proteínas *canales iónicos* y *bombas iónicas* transmembrana, que pueden ser activadas por diferentes *señales* tales como: la diferencia de voltaje transmembrana, la interacción con neurotransmisores, sus agonistas y antagonistas y, en el caso de las proteínas bombas con moléculas de ATP. Tales proteínas se distribuyen con densidades diferentes, en localizaciones precisas de la superficie de la membrana plasmática. En el caso de las neuronas, en las dendritas, soma neuronal, cono axónico, nodos de Ranvier, membrana del axón y membrana presináptica. Esta organización molecular determina una diferenciación de la función en relación con la estructura molecular. El resultado es que cada neurona tiene su *idiosincrasia funcional*, es decir, es capaz de producir potenciales de acción de amplitud, frecuencia y ritmo altamente selectivos, exclusivos, que permiten diferenciar una

neurona del resto de las de su entorno. Esta es una peculiaridad única de este tipo de células. En la superficie de un ganglio cerebroideo de *Helix aspersa* (Fig. 5) cada neurona difiere de las de su entorno en estos parámetros que, en un experimento, nos sirven como medida de su estado funcional. Esto nos permite un reconocimiento preciso de las distintas neuronas, y la construcción de mapas (Fig.6B).

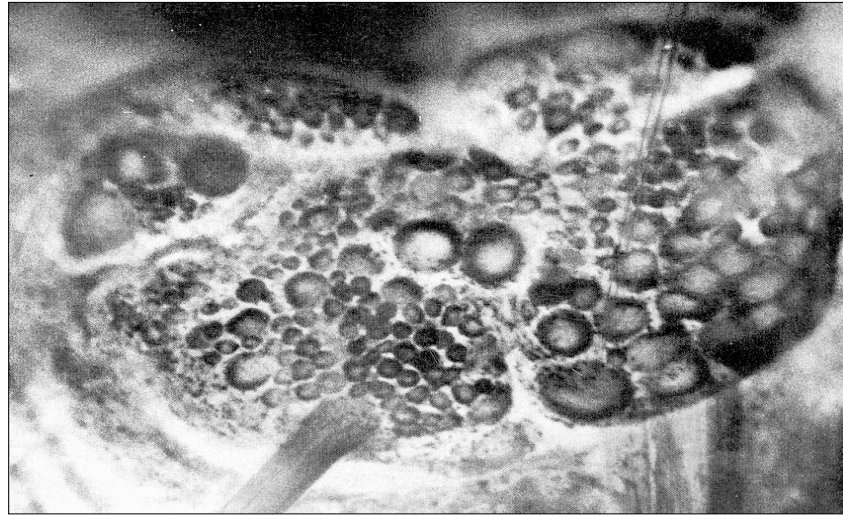


Fig. 5.- Fotografía de la superficie de los ganglios visceral, parietal derecho y parietal izquierdo una vez realizada la disección. Se observa un microelectrodo introducido en la neurona F2 (Kerkut et al., 1975). El número de células con las que hemos trabajado es de aproximadamente 120.

¿Por qué experimentar con neuronas de invertebrados (*Helix aspersa*, molusco) y no con neuronas de mamífero?. En los moluscos el sistema nervioso central (SNC), está constituido por grupos de neuronas que forman ganglios cerebroideos de organización muy sencilla (Fig.6): los somas neuronales ocupan la periferia de los ganglios y los axones se disponen radialmente hacia el centro formando el neuropilo (Fig.7). La disección del SNC deja al descubierto las neuronas, que son visualizadas con una lupa de pocos aumentos (Figs.3 y 8), y son accesibles para la introducción de microelectrodos (Fig.5).

Los ganglios se mantienen dentro de una pequeña cámara aislante (de metacrilato transparente), sumergidos en solución Ringer específica de moluscos. Se pueden así modificar fácilmente las concentraciones iónicas del Ringer y aplicar agonistas y antagonistas de los neurotransmisores u otro tipo de molécula en estudio. Esta disposición experimental permite, por lo tanto, hacer registros de la actividad electrofisiológica intracelular

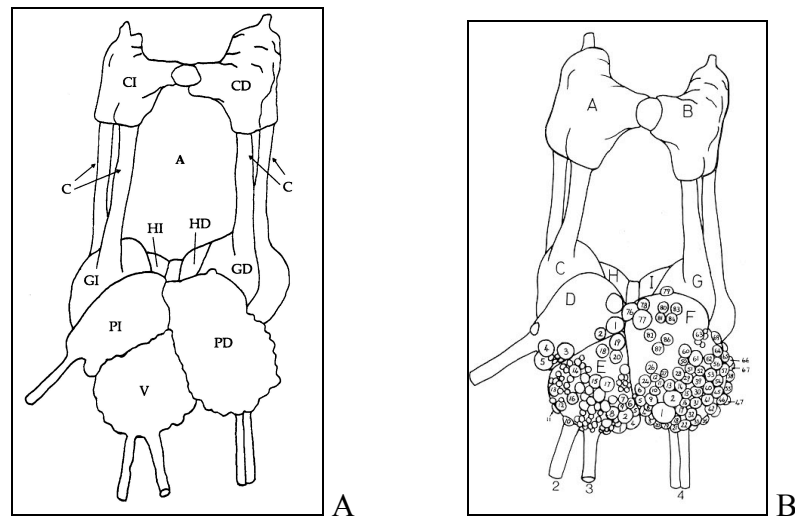


Fig.6.- Diagrama de los ganglios que forman el sistema nervioso central de *Helix aspersa* (A) y la disposición de las neuronas en la superficie de los ganglios una vez se ha retirado el conectivo protector (B). A) Los ganglios se denominan: cerebroideos izquierdo (CI, A) y derecho (CD,B); pedios, izquierdo (GI, C) y derecho (GD, G); pleurales izquierdo (HI, H) y derecho (HD, I); parietales izquierdo (PI, D) y derecho (PD, F) y visceral (V, E). Las dos masas de ganglios supra y subesofágicos están conectados por comisuras (C) que forman el anillo periesofágico (A). B) Se muestra un mapa con la localización y numeración de algunas de las neuronas en la superficie del ganglio accesibles a los microelectrodos (modificado de Kerkut et al., 1975).

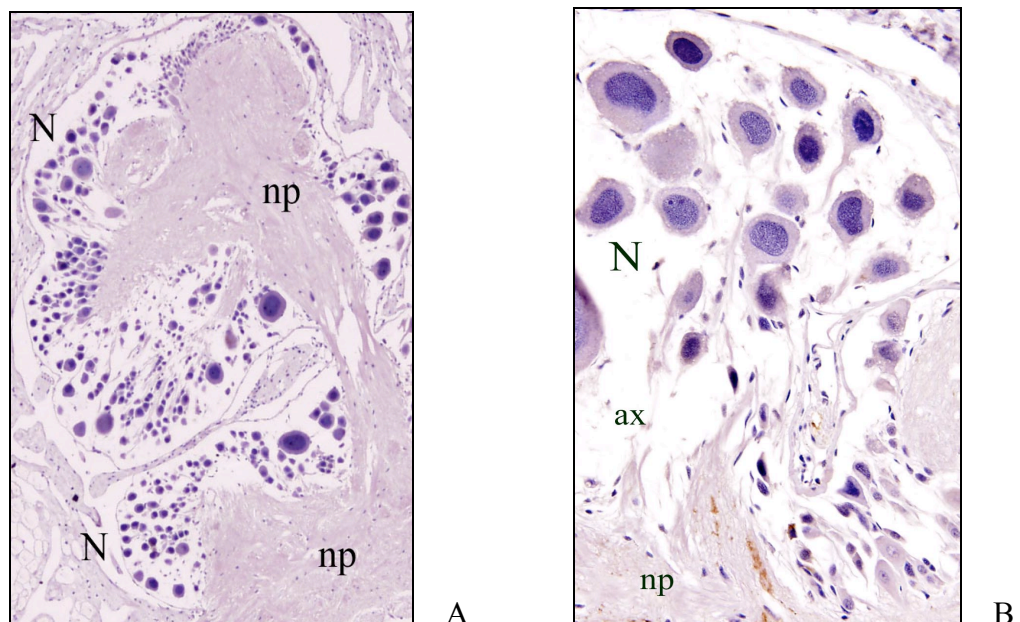


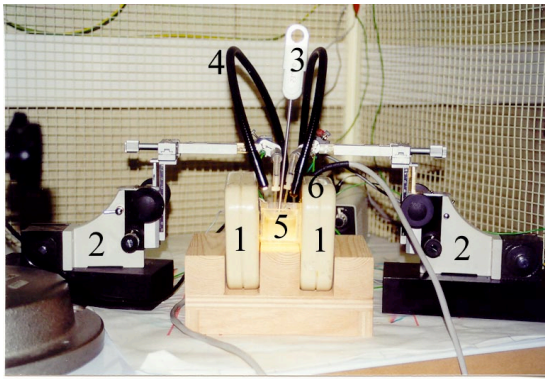
Fig.7.- Método de determinación de la conexina 26 por inmunocitoquímica. Contraste con hematoxilina de Harris. A (10x), panorámica de los ganglios cerebroideos, las neuronas (N) ocupan la periferia del ganglio. B (40x), detalle de las neuronas (N) con los axones (ax) dirigidos hacia el neuropilo (np) (Raso, 2005).

desde neuronas *individuales* y *en tiempo real* (Fig.8). Permite repetir los experimentos en el mismo tipo de neurona desde especímenes diferentes. Permite controlar determinadas variables (concentraciones iónicas y moleculares del medio extracelular, temperatura, pH, actividad bioeléctrica espontánea, etc.) lo que, a su vez, permite profundizar en las bases iónicas y moleculares de las respuestas inducidas en las neuronas realizando experimentos basados en hipótesis previas. En el caso del SNC de mamíferos solo ciertas estructuras del hipocampo reúnen las condiciones necesarias para realizar estudios *in vitro* similares a los descritos. Aun así, las neuronas no se pueden visualizar y los registros intracelulares son más difíciles de conseguir y son aleatorios, no se puede escoger, por ejemplo, el tipo de neurona con la que repetir el experimento.

### **3- SINCRONIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOELÉCTRICA NEURONAL BAJO EXPOSICIÓN A CAMPO MAGNÉTICO SINUSOIDAL DE ELF.**

De entre los resultados obtenidos a lo largo de nuestra investigación, hemos elegido en esta presentación el efecto inducido de *sincronización de la actividad bioeléctrica de pares de neuronas* bajo exposición a campo magnético sinusoidal de 50 Hz. Después de cierto tiempo bajo exposición a CM sinusoidal se observa, desde neuronas individuales, el desarrollo de actividades *oscilatoria* y de *reclutamiento* que pudieran reflejar un proceso de sincronización de las actividades de neuronas integradas en redes neuronales alejadas. Con el fin de estudiar esta hipótesis se realizaron una serie de experimentos registrando la actividad desde pares de neuronas escogidas al azar (Fig.9). Hemos así observado la inducción de procesos de sincronización en el 27% de las neuronas estudiadas bajo exposición a 50 Hz en el rango de 1-15 mT de intensidad de pico del campo magnético aplicado.

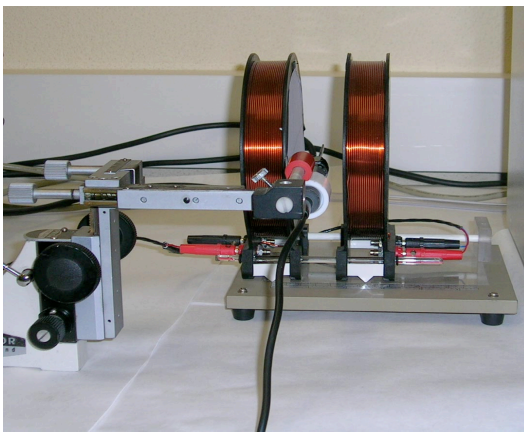
En la Fig.9 se muestra un mapa con la localización de los pares de neuronas desde los que se ha observado sincronización. Las distancias entre los centros de las neuronas de los pares estudiados se muestran en la Tabla 1. En la Fig.10 se muestra un potencial de acción de una neurona de *Helix aspersa* donde se señalan los parámetros que estamos estudiando.



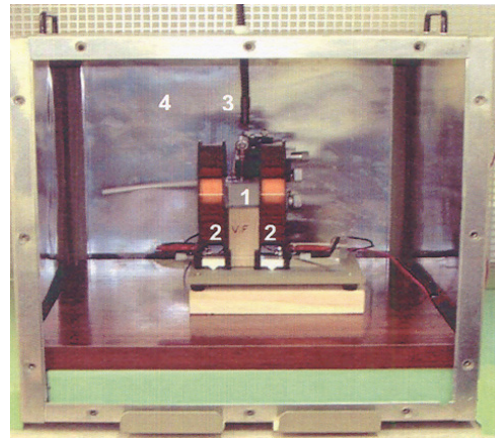
A



B



C



D

Fig.8.- A) Carretes de Helmholtz (1) utilizados para la aplicación de CM sinusoidal de ELF. Entre los dos carretes se observa la cámara (5) donde se disponen los ganglios sumergidos en solución Ringer. Las muestras se iluminan con luz fría (4). Se controla continuamente la temperatura de la solución (3). Los microelectrodos (6) se sujetan a los micromanipuladores (2) por medio de preamplificadores. B) Los carretes de Helmholtz (1) se disponen de tal forma que el CM aplicado es perpendicular a las líneas de fuerza del CM terrestre (CMT). En la fotografía se muestra la sonda flux-gate (2) que mide el valor cero de la componente horizontal del CMT. C) Carretes de Helmholtz con los que se han aplicado CM sinusoidales de 0,2-2-12  $\mu\text{T}$ . D) cámara de Mumetal (Ni: 76,6%; Cu: 4,5%; Mo: 3,3%; Fe: 14,7%) aislante utilizada para los experimentos en los que se han aplicado intensidades de CM de ELF de 0,2 a 12  $\mu\text{T}$ . Los valores medidos de la componente continua y variable del CM en el exterior de la cámara de Mumetal son 30,28 y 0,30  $\mu\text{T}$  respectivamente, y en el interior 0,24 y 0,14  $\mu\text{T}$  respectivamente. El grado de apantallamiento es mayor para la componente estática. Recientemente se ha procedido a la instalación de una segunda cámara de Mumetal dentro de la cual se dispone esta primera. Se ha conseguido incrementar el apantallamiento de la componente alterna en el mismo orden de magnitud que la estática.

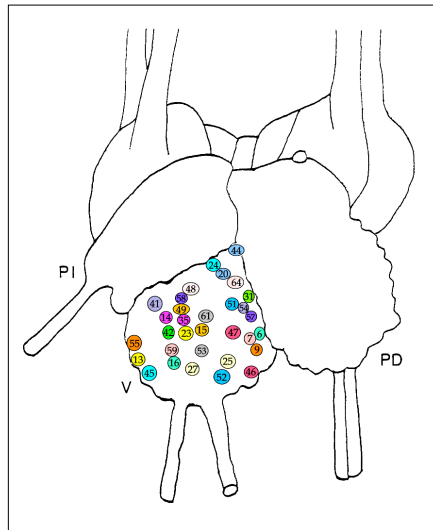


Fig.9.- Mapa de los pares de neuronas en los que se ha estudiado el proceso de sincronización neuronal bajo CM sinusoidal de 50 Hz, 1-15 mT. Las neuronas de cada par están señaladas con el mismo color (Calvo, 2003).

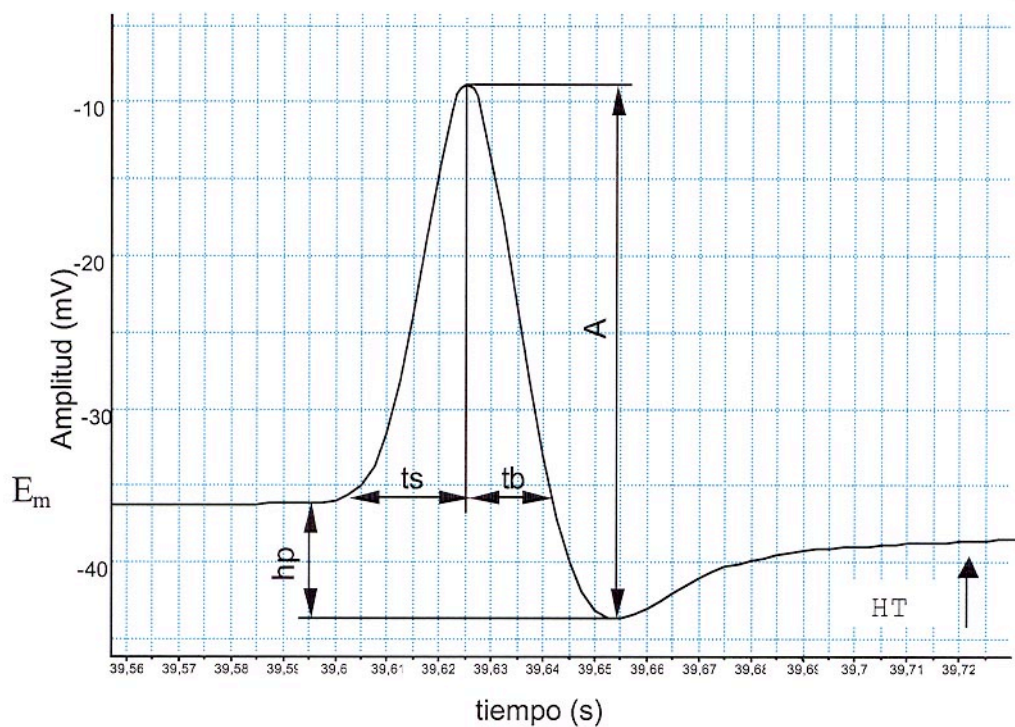


Fig.10.- Potencial de acción de una neurona de *Helix aspersa* digitalizado en el PowerLab. A: amplitud total; hp: hiperpolarización. El valor en mV de la despolarización (entrada de  $\text{Na}^+$ ) es  $A-hp$ ; ts: tiempo de duración de la despolarización. tb: tiempo duración de la repolarización e hiperpolarización (salida de iones de  $\text{K}^+$ ); HT: hiperpolarización terminal, la activación de la bomba de intercambio  $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$  restablece las concentraciones iónicas iniciales lo que permite la recuperación del valor del potencial de reposo  $E_m$  (Pérez Bruzón, 2005)



Tabla 1.- Se indican los pares de neuronas estudiados y las distancias (en  $\mu\text{m}$ ) entre las neuronas del par (Calvo, 2003).

<b>Par de neuronas</b>	<b>Distancia (<math>\pm 10\mu\text{m}</math>)</b>
V23-V13	300
V31-V42	470
V14-V35	87
V24-V45	512
V41-V54	460
V9-V55	505
V58-V57	310
V44-V20	92
V6-V16	325
V47-V46	290
V7-V59	375
V64-V48	160
V15-V49	94
V25-V27	150
V61-V53	140
V51-V52	425

La progresión en el tiempo del proceso de sincronización se muestra en el experimento realizado desde las neuronas V20 y V44 (Figs.11 y 12). En la gráfica de la Fig.11 se muestra la evolución de la frecuencia de disparo de las dos neuronas con el incremento de la intensidad del campo aplicado (CMA, en la figura) y su evolución en el tiempo (100 min de duración del experimento). Desde el inicio de la aplicación de campo (minuto 2) las frecuencias distintas se modifican en paralelo para ambas neuronas. Coincidiendo con la intensidad máxima del campo aplicado, las frecuencias disminuyen abruptamente, en paralelo, en las dos neuronas, observándose puntos de coincidencia de las frecuencias. A medida que la intensidad de campo disminuye, aumentan las frecuencias para ambas neuronas (minutos 25 a

30) volviendo a valores próximos a los iniciales (*reversibilidad* del efecto inducido). Una vez se ha dejado de aplicar el CM (minuto 35), y con un tiempo de retardo de 14 min, las frecuencias de ambas neuronas se hacen totalmente coincidentes (sincronización). La sincronización se mantiene aproximadamente durante 32 min. En el minuto 60 se repite el experimento. Se observa que se mantiene la sincronización durante 23 min y con la intensidad máxima de campo la frecuencia de la neurona V44 cae a cero, mientras que la frecuencia de la neurona V20 aumenta recuperando su valor inicial ( $\approx 3\text{Hz}$ ) en 7 minutos. Se produce en consecuencia la desincronización.

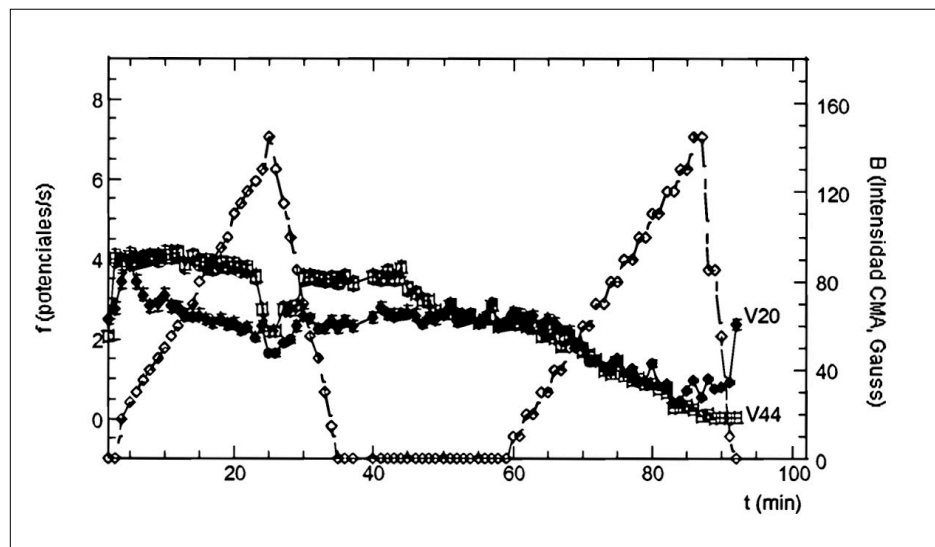


Fig.11.- Proceso de sincronización entre el par de neuronas V20 y V44. Se representa la variación de la frecuencia de la actividad de las dos neuronas, expresada en potenciales/s ( $\blacklozenge$  V20;  $\square$  V44), frente a la variación de la intensidad del campo aplicado B ( $\diamond$ , Gauss) y también su evolución con el tiempo (100 min) de duración del experimento (Azanza et al., 2002 a).

En la Figura 12 (parte A) se ha expandido la parte de la gráfica de la Fig.11 correspondiente a los minutos 35 a 60 en los que se puede observar en mayor detalle la progresión de la sincronización. Observando los registros bioeléctricos (parte B) se destacan diversos aspectos peculiares como son la coincidencia temporal de las inhibiciones y de las estimulaciones de corta duración así como la de los potenciales bioeléctricos que definen el estado de sincronización (minuto 55).

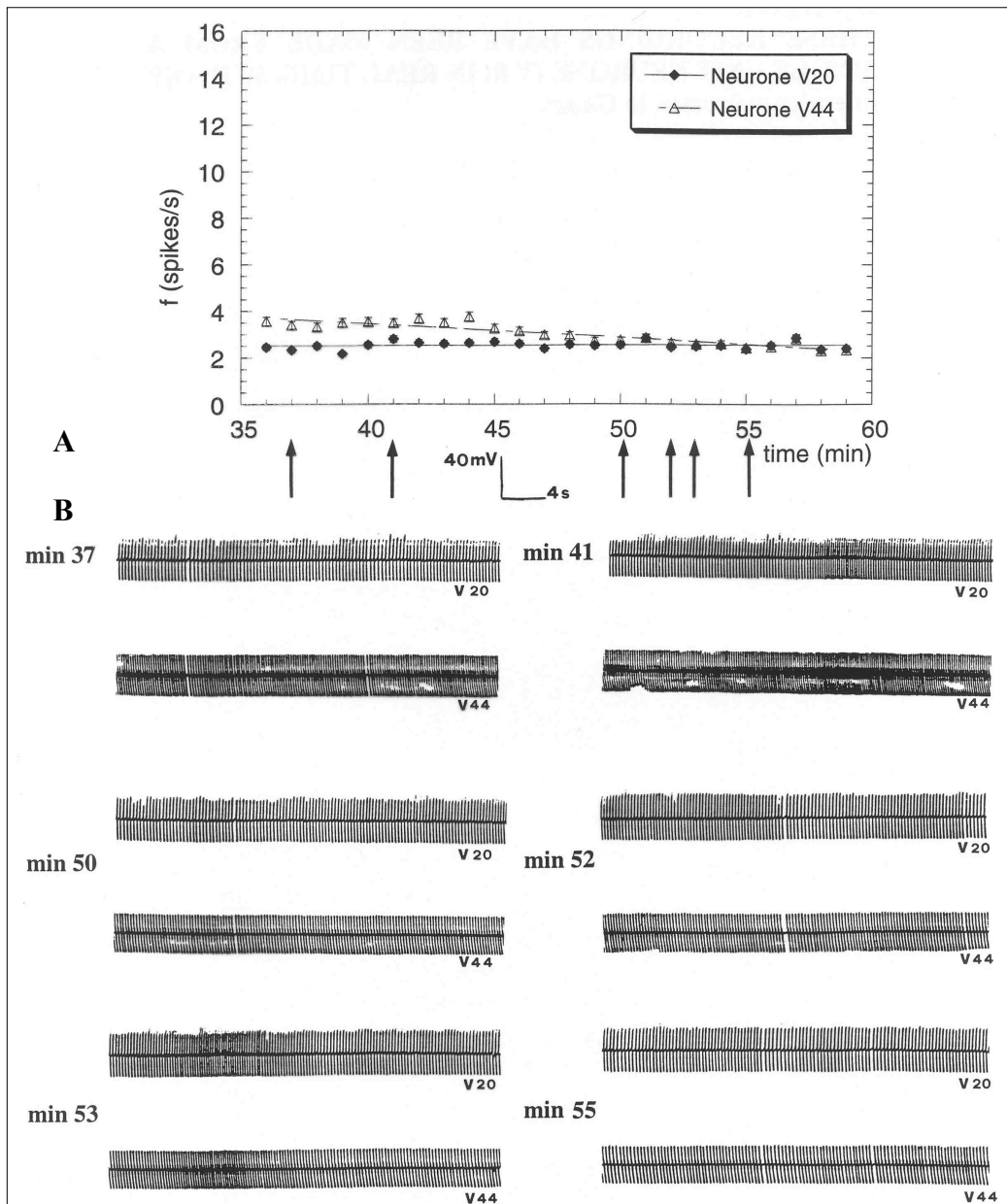


Fig.12.- A) Se han ampliado los minutos 35 a 60 de la gráfica de la Fig.9. Las flechas señalan los tiempos para los que se han seleccionado los registros bioeléctricos del par de neuronas que se muestran en la parte B. En B) se puede observar la progresión hasta la total sincronización en el minuto 55 (Azanza et al., 2002 a).

A la vista del desarrollo del experimento nos podemos plantear en qué medida el proceso de sincronización es debido al CM aplicado y en qué medida puede ser un proceso espontáneo, fisiológico con intervención de otros parámetros. De ahí surge la necesidad de responder a tres cuestiones esenciales: 1) ¿La sincronización pudiera ser consecuencia de la propagación de la señal bioeléctrica en el seno del medio altamente conductor (solución Ringer salina)?; 2) ¿La sincronización se debe a que ambas neuronas están interconectadas

mediante sinapsis químicas?; 3) ¿La sincronización se debe a que ambas neuronas están relacionadas mediante sinapsis eléctricas (uniones gap)?.

Hemos demostrado que no se produce transmisión de voltaje en el medio extracelular entre los pares de neuronas. El experimento realizado se muestra en la Figura 13 A y B.

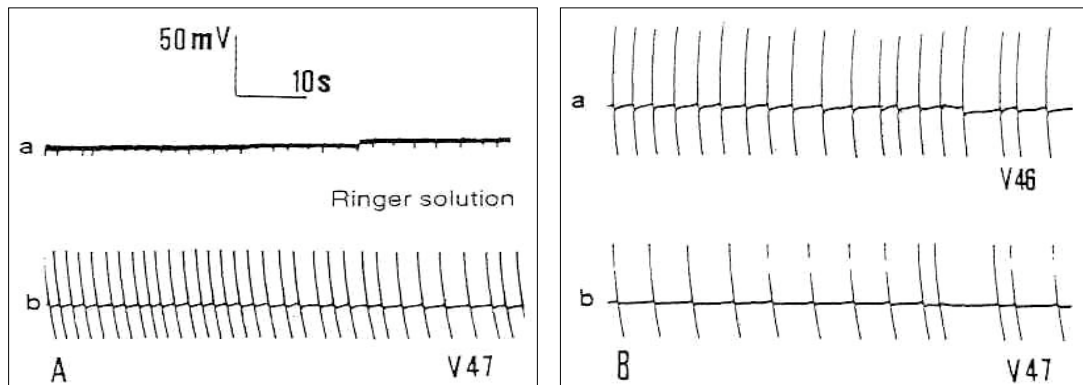


Fig.13.- A) Los dos microelectrodos se sumergen en paralelo en la solución Ringer. Uno de los electrodos (b) se ha introducido en la neurona V47, el segundo electrodo (a) registra un 2% de la actividad bioeléctrica de la neurona. Este valor representa la media calculada de medidas realizadas en 20 experimentos en los que la amplitud de los potenciales bioeléctricos es de  $\approx 60$  mV. B) Cuando el segundo microelectrodo (a) es introducido en la neurona V46 se observa que la actividad registrada desde el par de neuronas es totalmente independiente. La membrana plasmática actúa como aislante de la actividad bioeléctrica intracelular. (Azanza et al., 2002 a)

Si las neuronas estuvieran interconectadas mediante sinapsis químicas, se podría esperar un *retardo sináptico*. En la Fig.14 se muestra este tipo de relación en condiciones de actividad espontánea, la cual se mantiene bajo aplicación de cafeína y glutamato. Por comparación se puede observar que en el par de neuronas de la Fig.14 no existe ningún tipo de interdependencia y la actividad de las neuronas se mantiene independiente frente a la administración, en la solución Ringer, de cafeína, glutamato y acetilcolina. El retardo sináptico observado en la Fig.14 no se observa en la Fig.15.

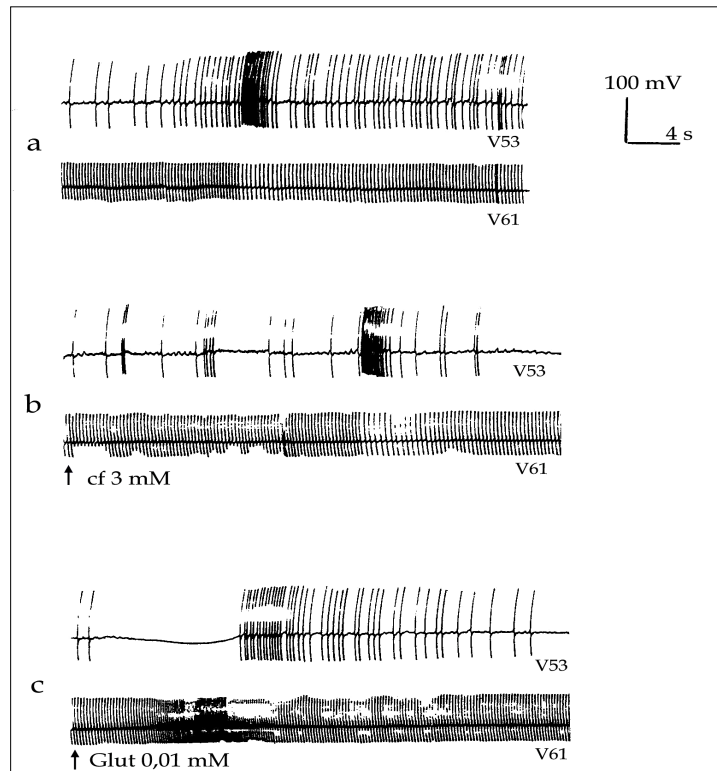


Fig.14.- a) Actividad espontánea desde el par de neuronas V53 y V61. Las actividades bioeléctricas no son simultáneas para el par. Pero se pueden interpretar los registros como la existencia de una dependencia de la actividad de una neurona, la V53 por ejemplo con respecto de la V61, dado que la activación de la V53 es posterior a la activación de la V61. El desfase en la estimulación de la V53 nos da una medida del *retardo sináptico*: tiempo invertido entre la liberación del neurotransmisor estimulador desde la V61, su difusión en la hendidura sináptica, la interacción con el receptor de la membrana postsináptica y la inducción de la respuesta de estimulación en la neurona V53. b) y c) bajo administración de cafeína (cf) y glutamato (Glut), en la solución Ringer, se mantiene el retardo observándose la acción específica del glutamato, diferente para cada una de las dos neuronas: inhibición en V53 y estimulación en V61 (c). Obsérvese que tanto la cafeína como el glutamato estimulan la actividad de la neurona V61. En el experimento *no* se ha aplicado CM (Azanza et al., 2005 a).

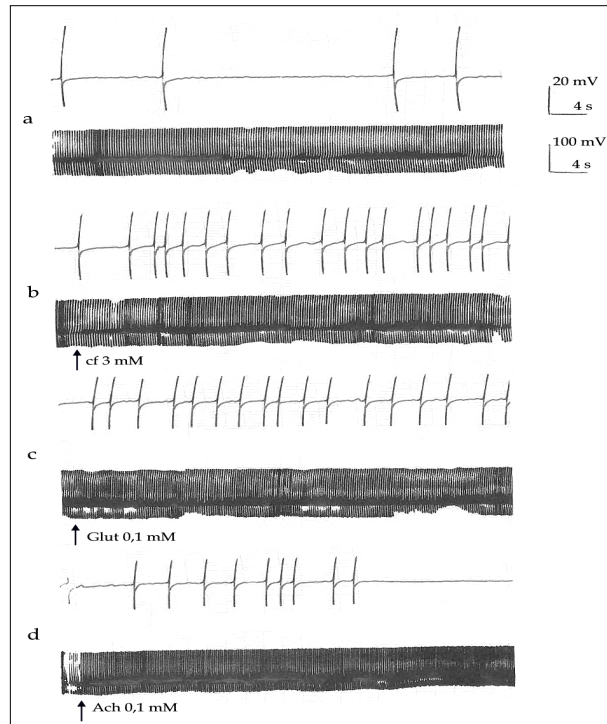


Fig.15.- a) Actividad espontánea. En experimentos sucesivos se añaden a la solución Ringer: b) cafeína (cf); c) glutamato (glut) y d) acetilcolina (Ach). Se mantiene la independencia en la actividad de las dos neuronas. Se deduce que entre este par de neuronas no existe conexión mediante sinapsis química. En el experimento *no* se ha aplicado CM. (Azanza et al., 2005 a)

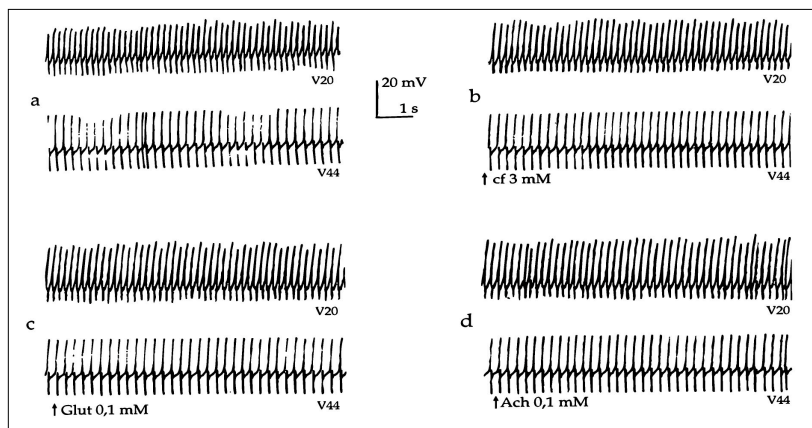


Fig.16.- El par de neuronas de este experimento, V20-V44, coincide con aquel en el que se realizó el experimento mostrado en las Figs. 9 y 10. Ambos experimentos se hicieron en días diferentes, con muestras biológicas distintas. Las frecuencias de ambas neuronas están próximas (registro a) pero su actividad se mantiene independiente. La aplicación de cafeína (cf), glutamato (glut) y acetilcolina (Ach) no inducen sincronización. La duración del experimento fue de 40 min. Compárese con lo ocurrido en  $\approx$  el minuto 30 min de actividad de la Fig. 10 en el valor del campo máximo aplicado (Azanza et al., 2005 a).

Asimismo en la Figura 16 mostramos los registros del par de neuronas V20-V44, en que espontáneamente (a) y bajo la acción de glutamato, cafeína y acetilcolina (b, c y d), se mantienen desincronizadas. Pero ya vimos en el experimento mostrado en las Figuras 11 y 12, realizado en el mismo par pero desde otra muestra, que la aplicación de campo magnético inducía dentro de este período de tiempo, cortos intervalos de coincidencia de las frecuencias de ambas neuronas antes de consolidarse la actividad de sincronización. El experimento mostrado en la Fig.16 apoya la hipótesis de la inducción de la sincronización por parte del campo magnético aplicado.

Con el fin de evaluar en qué medida la sincronización se podría deber a que los pares de neuronas estuvieran relacionados con uniones *gap* hemos utilizado técnicas de microscopia electrónica (ME) y de caracterización por inmunocitoquímica (IC) de la proteína conexina 26, que es típica de las uniones *gap* de las neuronas de mamíferos (no hay muchos trabajos de caracterización de proteínas en moluscos con técnicas de IC y, los antisueros disponibles son todos de mamífero). Las uniones *gap* son el sustrato estructural de las denominadas *sinapsis eléctricas* en las que la propagación de la actividad bioeléctrica entre neuronas se hace mediante el flujo directo de iones entre las dos neuronas por los conductos de conexinas que forman estas especializaciones de membrana. En este tipo de contacto no se produce retardo sináptico en la transmisión del impulso nervioso entre neuronas. Supone un mecanismo de transmisión rápida de la actividad bioeléctrica entre células, incluso alejadas espacialmente. Estas especializaciones de membrana se pueden establecer tanto entre neuronas como entre neuronas y glía y entre células de glía. Se han considerado ser las responsables de la sincronización de la actividad de las neuronas en el encéfalo de mamíferos.

La microscopía electrónica muestra uniones tipo *gap* entre neuronas (Fig.17.A) y entre neuronas y células de glía (Fig.17 A y B). Las imágenes que hemos obtenido de inmunocitoquímica corroboran los resultados obtenidos con ME. Se observan neuronas grandes y pequeñas positivas para la conexina 26 (Fig.18). El número de neuronas positivas para la conexina 26 es relativamente pequeño en relación con el número de neuronas negativas y la distribución de las neuronas positivas en el seno de los ganglios no es homogénea (Figs.18 A, B y C). Hemos observado alta densidad de reacción en el neuropilo que podría deberse a la contribución de las expansiones de la glía positiva, además de los axones de las neuronas, procedentes de diferentes secciones de los ganglios (Fig.18 A y C). A diferencia de mamíferos, hemos encontrado en *Helix aspersa* que las células de glía también

expresan la conexina 26, sus ramificaciones se distribuyen entre las fibras del neuropilo y entre los somas neuronales (Fig.18 C).

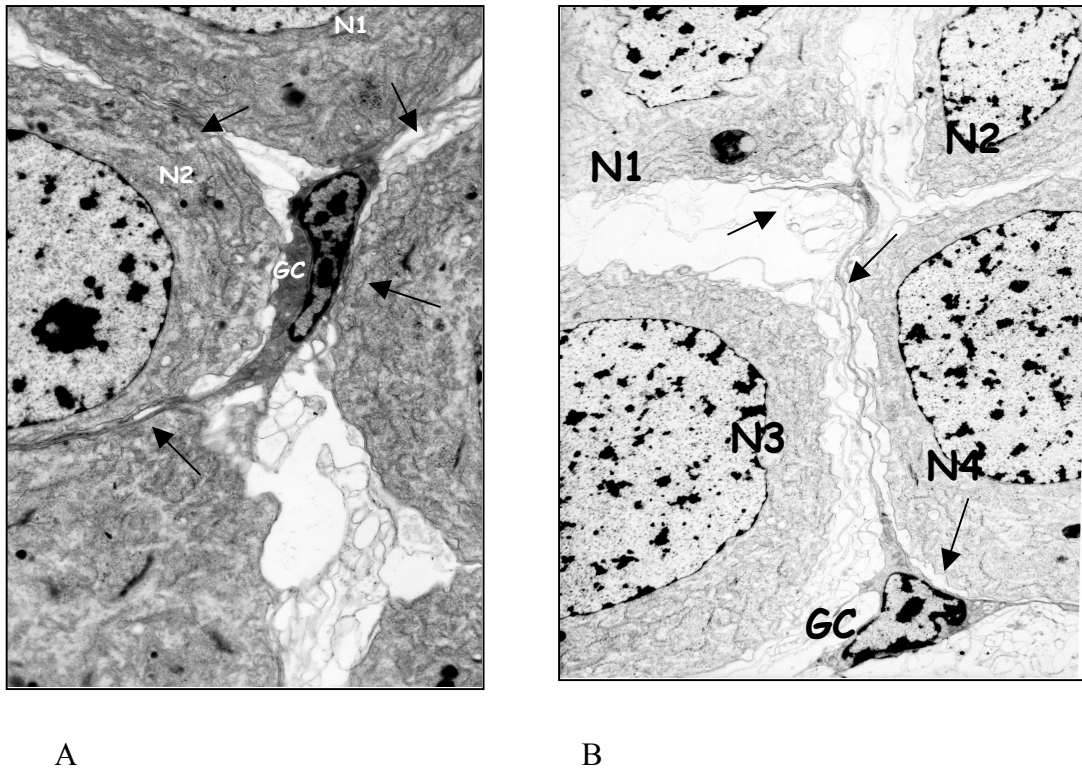


Fig.17.- A) (3000x) Uniones *tipo gap* (flechas) entre neuronas (N1, N2) y entre una célula de glía (GC) y varias neuronas. En B) (3000x) se muestran cuatro neuronas (N1, N2, N3, N4) y una célula de glía (GC) con expansiones que forman uniones *tipo gap* con las neuronas. El espacio entre las neuronas presenta una alta densidad de expansiones de membrana procedente de las células de glía (Azanza et al., 2005 b).

En una primera aproximación el número de neuronas positivas para la conexina 26 ( $\approx 5,4\%$ ) es altamente insuficiente para explicar la conducta de sincronización observada en el 27% de las neuronas estudiadas (cerca de 120 de entre las neuronas más grandes situadas en la superficie de los ganglios (Fig.5)). Si el fundamento de la sincronización fuera *exclusivamente* las uniones gap, el 27% de las neuronas deberían expresar la conexina 26 puesto que los conexones de las uniones gap están constituidos por hemiconexones sintetizados por el par de células entre las que se establecen estas especializaciones de membrana.



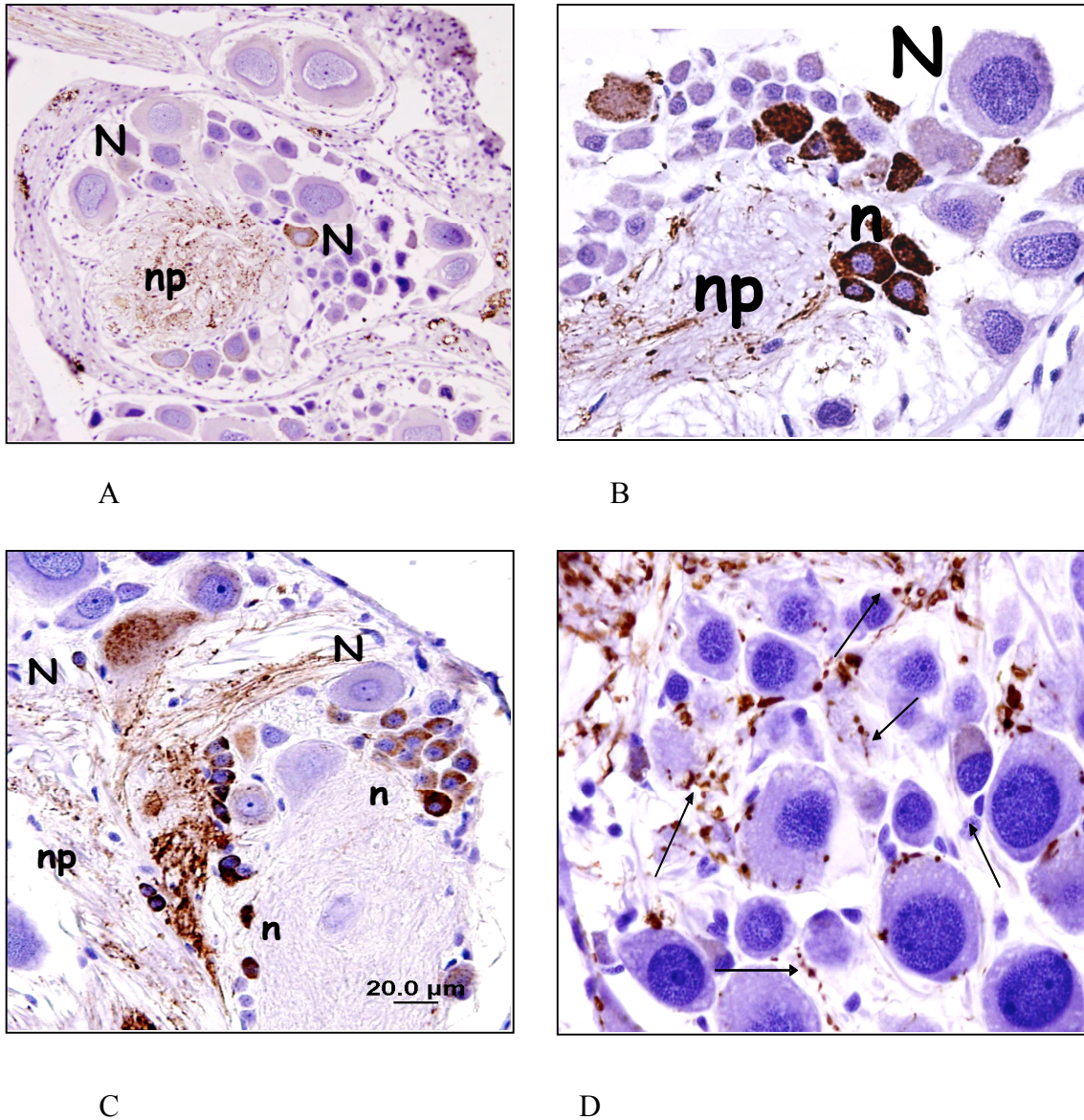
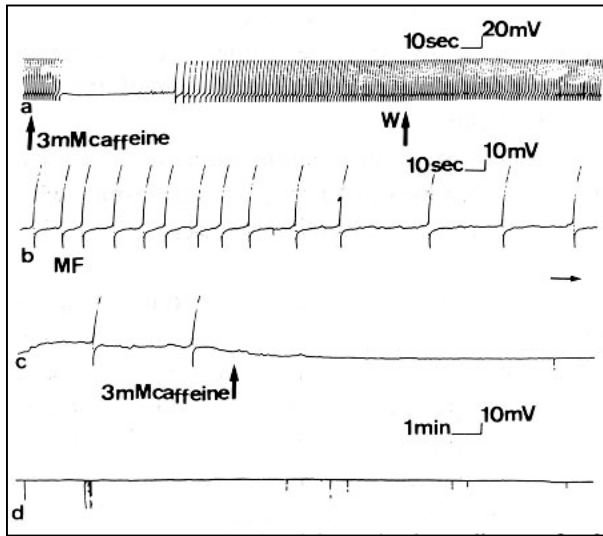


Fig.18.- Reacción de inmunocitoquímica para la conexina 26. A, (10x) Vista panorámica, son escasas las neuronas grandes (N) con reacción positiva. La alta densidad de reacción en el neuropilo (np) se debe a las ramificaciones de la glía y a los axones de las neuronas positivas procedentes de otras localizaciones en los ganglios. B) C) (20x) Las neuronas de pequeño tamaño (n) positivas se localizan en grupos próximas al neuropilo (np). D) (40x) Expansiones positivas de las células de glía (flechas) se distribuyen entre las neuronas. (Azanza et al., 2005 b).

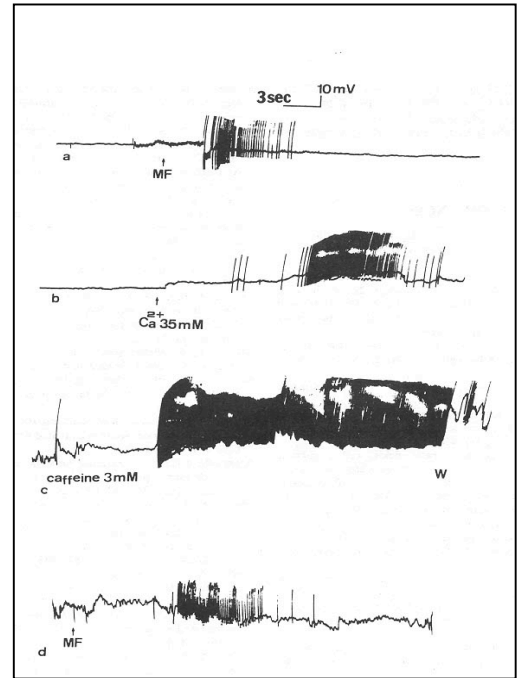
La sincronización es una actividad de estimulación que implica a un cierto número de neuronas, pertenecientes a circuitos neuronales más o menos alejados entre sí. La actividad bioeléctrica de las mismas se hace coincidente en el tiempo y todas las neuronas implicadas disparan con la misma frecuencia (Figs. 11 y 12). Dicha actividad está asociada con las redes neuronales glutamérgicas y con mecanismos citosólicos  $Ca^{2+}$ -dependientes. Las células de

glía que rodean las sinapsis químicas de la red son estimuladas por el glutamato liberado que interacciona con receptores específicos de membrana. El glutamato estimula los mecanismos que promueven las ondas de calcio que se propagan por el citoplasma de las células gliales y, a través de las uniones gap al resto de las células de glía conectadas entre sí, en el neuropilo. La red de glía puede así conectar neuronas de circuitos diferentes, más o menos alejados del primero. Estas neuronas serán estimuladas, a su vez, por el glutamato liberado por la glía en las sinapsis químicas interneuronales. De esta forma, la propagación de la estimulación necesita de la expresión de la conexina 26 en las células de glía y en las neuronas que forman uniones gap, pero no es imprescindible que todas las neuronas glutamaérgicas, finalmente sincronizadas, expresen la conexina.

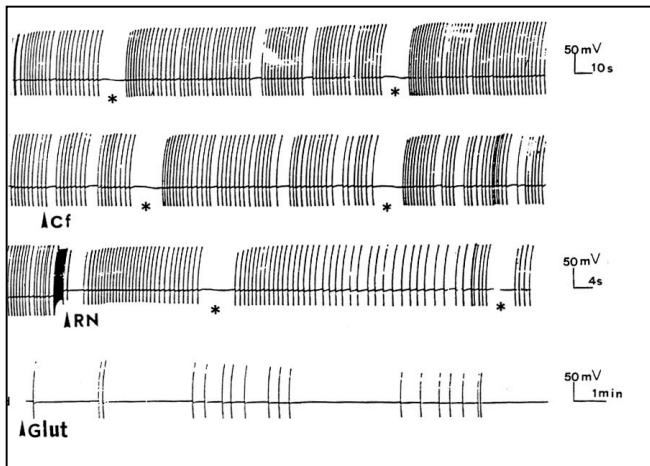
Hemos demostrado que tanto el CM estático como el CM dinámico sinusoidal (de 50 Hz) *mimetizan* el efecto del glutamato y la cafeína en las neuronas (Fig.19). En el SNC de *Helix aspersa* se encuentran neuronas que son estimuladas y neuronas que son inhibidas por el glutamato y por la cafeína (en mamíferos el glutamato y es estimulante). Ambas moléculas inducen sus efectos incrementando la concentración del calcio libre citosólico por mecanismos moleculares diferentes. El glutamato activa los canales de calcio en los receptores NMDA y la cafeína activa los canales de calcio de la membrana del retículo endoplasmático (receptores de la rianodina), que actúa como secuestrador de calcio en las células, no obstante, el resultado final es que sus acciones son miméticas y altamente específicas. Hemos puesto de manifiesto que ambos efectos, de estimulación y de inhibición, están mediados, en el caso del glutamato, por los receptores NMDA (Fig.20). Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis del calcio: la interacción del campo magnético aplicado con las membranas plasmáticas de las neuronas, por algún mecanismo, promueve el incremento de la concentración del calcio libre en el citosol que actúa, entonces, como efector citosólico promoviendo los efectos biológicos observados de estimulación e inhibición de la actividad bioeléctrica de las neuronas con un alto grado de especificidad.



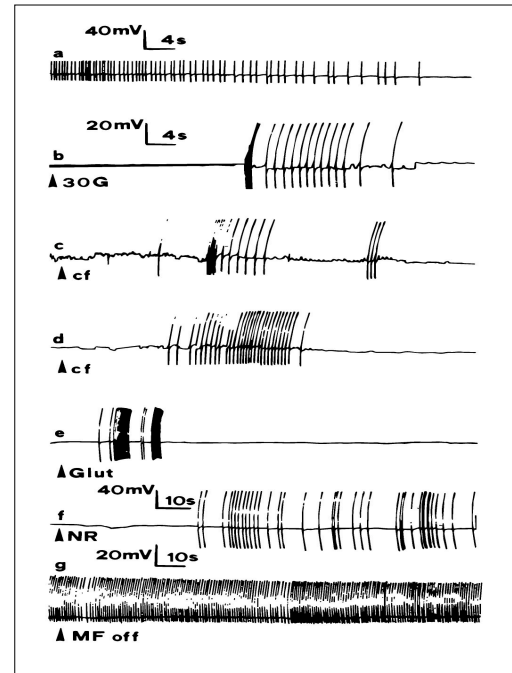
A



B



C



D

Fig.19.- Cafeína y glutamato mimetizan los efectos de inhibición y estimulación del CM estático (A)(B) y del CM sinusoidal de 30 G, 50 Hz (C)(D). (A) CM de 2,6 kG (MF) mimetiza el efecto inducido por la cafeína 3 mM (Azanza, 1989); B) (a) CM de 2,6 kG (MF) estimula la neurona transitoriamente; b) alta concentración de 35 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  en el Ringer mimetiza el efecto del CM estático; (c) cafeína 3mM mimetiza los efectos del CM y del  $\text{Ca}^{2+}$  (Azanza y del Moral, 1994). (C) cafeína 3mM disminuye la frecuencia, el efecto es mimetizado por glutamato  $10^{-2}$  mM. (D) El efecto estimulante de 30 G es mimetizado por la cafeína y el glutamato (Calvo y Azanza, 1999 a). Obsérvese que, en todos los experimentos mostrados, el tipo de respuesta es específica de cada neurona. Individualmente, cada neurona emite una respuesta que mantiene ciertas características comunes independientemente de que se haya aplicado CM o una sustancia química.

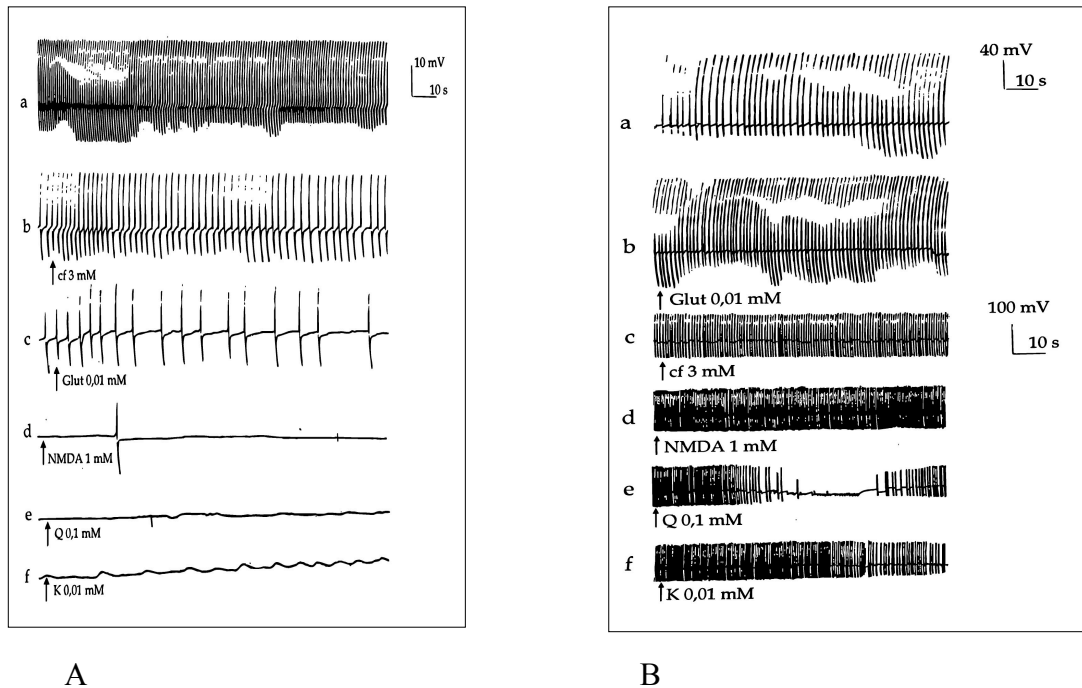


Fig.20.- Las actividades de inhibición (A) y estimulación (B) inducidas en las neuronas por el glutamato (Glut) son mediadas por los receptores NMDA. La cafeína (cf) mimetiza los efectos inducidos por el glutamato en ambos casos. No se aplicó CM (Azanza et al., 2005 a).

La función del calcio como efector citosólico de la interacción del CM con la membrana plasmática ha sido ampliamente demostrado en nuestros experimentos, utilizando glutamato, cafeína, antagonistas de los canales iónicos y modificando las concentraciones iónicas de las soluciones Ringer, bajo aplicación de CM estáticos (Azanza y del Moral, 1988; Azanza, 1989; Azanza, 1990, Azanza, 1993) y CM sinusoidal (Azanza y del Moral, 1998; Calvo y Azanza, 1999 a,b). Dentro de los límites de nuestras condiciones experimentales, aproximadamente *el 82% de las neuronas son magnetosensibles*. En el 50% se observa una *disminución* de la frecuencia de disparo, y la eventual inhibición de la actividad bioeléctrica, mientras que en el 20% la frecuencia aumenta produciendo la *estimulación* de la actividad bioeléctrica. Bajo exposición a CM sinusoidal de ELF el 12% de las neuronas muestra respuestas complejas bifásicas de estimulación e inhibición. La exposición prolongada a CM estático de intensidad de 0.7 T induce conjuntamente la disminución de la amplitud de los potenciales, hasta su *total abolición*, en aproximadamente un 15% de las neuronas (Fig.27). La sensibilidad de las neuronas es mayor al CM sinusoidal de ELF que al CM estático, de acuerdo con las intensidades de campo aplicadas y el umbral de intensidad de campo para inducir una respuesta. Ambos efectos, de inhibición y estimulación, son inducidos por el

calcio libre citosólico. De aquí postulamos la hipótesis de que como consecuencia de la exposición al CM aumenta la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol. De acuerdo con las respuestas al CM hemos clasificado las neuronas en dos grandes grupos que deben tener características ultraestructurales de membrana altamente específicas, en relación con los tipos de canales iónicos que expresan diferencialmente. La estimulación se debe al efecto despolarizante de la membrana, inducido directamente como consecuencia del incremento de la concentración de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . La inhibición se debe a la activación de los canales de  $\text{K}^+$ -activados por el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y subsiguiente hiperpolarización de la membrana como consecuencia de la pérdida de  $\text{K}^+$  en el medio intracelular. Estamos actualmente procediendo a la caracterización, por inmunocitoquímica, de una amplia variedad de canales iónicos que pudieran expresar las neuronas de *Helix aspersa*. Con esta metodología se exploran neuronas presentes en todo el volumen de los ganglios, mientras que en los registros de neurofisiología limitamos el estudio a las neuronas que se observan en la superficie de los ganglios y que son de mayor tamaño, por las dificultades de la introducción de los microelectrodos (Fig.5). Los primeros datos que hemos obtenidos son coherentes con los resultados de electrofisiología. Todas las neuronas expresan los canales de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  de rectificación retardada, principales responsables de la producción de los potenciales de acción (Fig.10). Un elevado tanto por ciento de las neuronas expresan canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los tipos SK2 (88%) y  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (93,6%) mientras que la expresión de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye a un 10% aproximadamente para los tipos N y P/Q (Fig.21).

Podemos, por tanto, concluir que las modificaciones de la actividad neuronal inducidas por exposición a CM, tanto estático como sinusoidal de ELF, están mediadas por los iones de calcio, que son liberados en el seno del citoplasma debido a la interacción del CM con la membrana plasmática. Todo ello de acuerdo con el modelo de superdiamagnetismo anisotrópico y la explosión coulombiana subsiguiente que promueve la liberación de iones de calcio desde sus sitios de enlace en las moléculas de lípidos de las membranas (del Moral y Azanza, 1992, 2002; Azanza et al., 1993, 2001), como veremos a continuación en detalle (§ 4). El CM aplicado producirá el mismo efecto, en las células de glía y en las neuronas. De esta forma, los circuitos de neuronas glutamérgicas y de células gliales son estimulados simultáneamente por el CM aplicado. En consecuencia, la actividad de sincronización puede progresar para las vías glutamérgicas de neuronas alejadas, por medio de la interconexión mediante uniones gap con los circuitos de glía, en buena concordancia con el modelo físico que hemos propuesto de formación de grandes clústeres de fosfolípidos de membrana (§ 4). Podemos considerar que la sincronización de la actividad de las neuronas está promovida por

las células de glía y es facilitada por el efecto de liberación de iones de calcio inducido por el CM aplicado.

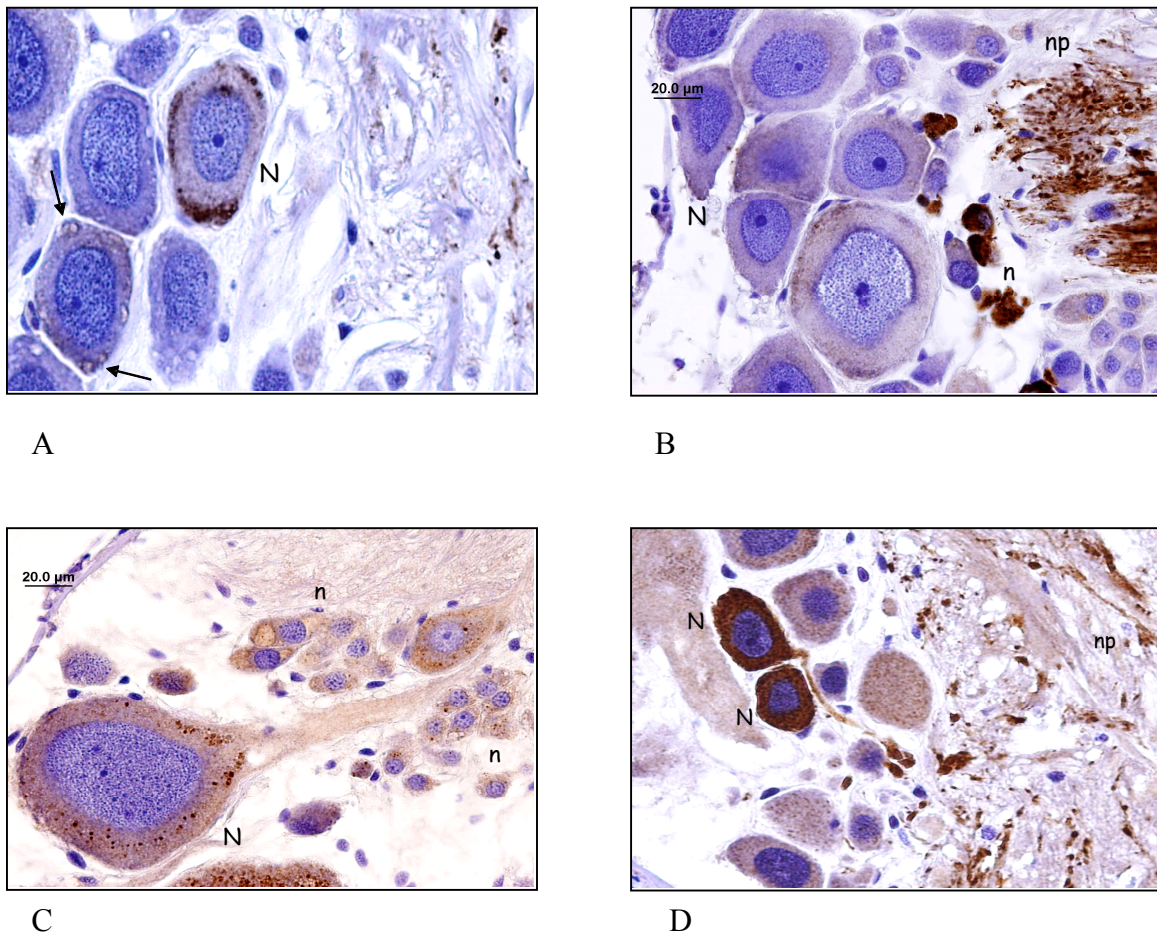


Fig.21.- La caracterización de las proteínas canales iónicos mediante reacción de inmunocitoquímica revela la expresión de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N en el 10 % de las neuronas (A). Los canales de  $\text{Na}^{+}$  (B) y de  $\text{K}^{+}$  de rectificación retardada (C) se expresan prácticamente en el 100% de las neuronas. Los canales de  $\text{K}^{+}$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular del tipo SK2 (D) se expresan en el 88% de las neuronas (Pérez Castejón et al., 2005)

#### **4.- EL SUPERDIAMAGNETISMO ANISOTRÓPICO Y LA LIBERACIÓN DE $\text{Ca}^{2+}$ DESDE LAS MOLÉCULAS DE ENLACE EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA EXPLICAN LAS RESPUESTAS NEURONALES A LOS CAMPOS MAGNÉTICOS APLICADOS, ESTÁTICOS Y SINUSOIDALES DE FRECUENCIA EXTREMADAMENTE BAJA.**

El modelo teórico que hemos propuesto explica las modificaciones de la actividad bioeléctrica de las neuronas bajo exposición a CM estático (del Moral y Azanza, 1992; Azanza et al., 1993; Azanza y del Moral, 1994; 1995 a,b; 1996) o CM sinusoidal de ELF (Azanza y del Moral, 1998; del Moral et al., 2002; Azanza et al., 2002; Pérez Bruzón et al., 2004), por mecanismos basados en la fuerte *anisotropía* de la *susceptibilidad diamagnética* (DS) de los fosfolípidos de la membrana (PPs). Los PPs actúan *cooperativamente* formando grandes clústeres correlacionados que se comportan como unidades individuales, un fenómeno denominado *superdiamagnetismo*. Cuando los PPs cargados con iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.22) rotan bajo el par de fuerzas magnético, aquellas “moléculas” de PP- $\text{Ca}^{2+}$ , que son vecinos más próximos (NN), con iones  $\text{Ca}^{2+}$  a ambos lados de la membrana (Fig.23) (en las hemicapas citosólica y extracelular respectivamente), se aproximan entre sí liberando  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol por un mecanismo simultáneo de *explosión coulombiana*. El incremento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico produce la despolarización de la membrana (estimulación de la actividad bioeléctrica), en unas estirpes neuronales, o la apertura de los canales de  $\text{K}^+$ -operados por  $\text{Ca}^{2+}$ , en otras, (disminución y eventual inhibición de la actividad bioeléctrica debido a la hiperpolarización de la membrana). Hemos encontrado teóricamente que la disminución de la frecuencia de disparo con el CM aplicado, es de la forma

$$f(B) = f(0) \exp [-\alpha B^2],$$

donde  $\alpha$  es relevante, contiene los principales parámetros físico-químicos de las membranas. Nuestro modelo predice y explica varias observaciones experimentales clave: 1) la disminución de la frecuencia de la actividad neuronal con el incremento de la intensidad del CM estático y del CM alterno de ELF aplicados; 2) la sincronización de la actividad neuronal bajo CM de ELF; 3) por qué son los CM de ELF los *relevantes* en la interacción de las neuronas con campos magnéticos variables con el tiempo; 4) la disminución del voltaje de la despolarización  $\Delta V_d$  con el incremento de la intensidad del CM estático o alterno aplicado, de acuerdo con la expresión:

$$\Delta V_d(B) = \Delta V_d(0) \exp [+ \alpha B^2],$$

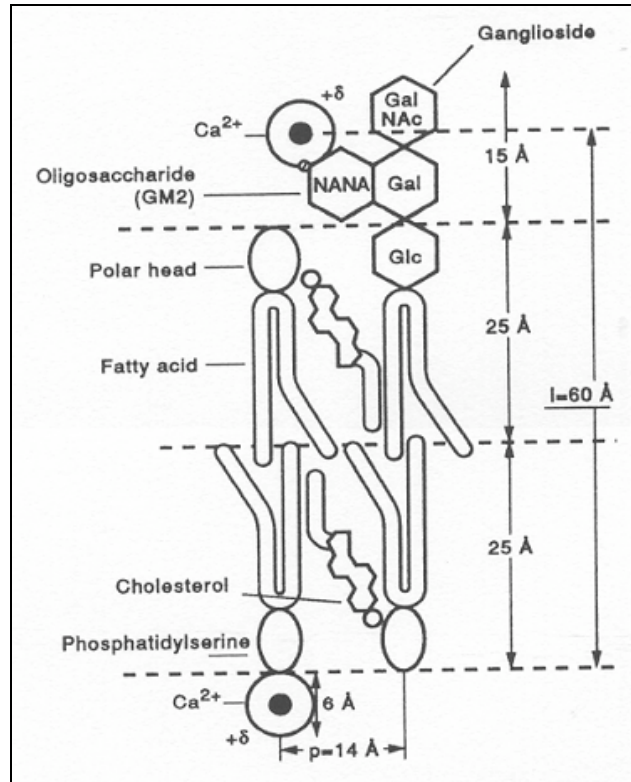


Fig. 22.- Esquema de la membrana de la neurona mostrando la fosfatidilserina (PS) y un glicolípido (GL) vecinos más próximos (en adelante NN), con una cabeza de gangliósido GM2. Ambas cabezas están negativamente cargadas con  $-e$  (modificado de Alberts et al., 1989). El contenido de PS de la hemicapa interna es en media de  $\approx 14\%$  del total de los PP de membrana, mientras que el contenido de GL en la hemicapa externa es  $\approx 10-20\%$ . Enlazados a las cabezas hay iones de  $\text{Ca}^{2+}$  solvatados por agua, y las cabezas tienen una carga efectiva positiva  $\delta_{\text{eff}}^+$ . Interpuestos entre los lípidos hay moléculas de colesterol con constante dieléctrica  $\epsilon_r = 2.21$ . Las dimensiones cruciales que intervienen en el modelo son,  $l \approx 60 \text{ \AA}$  y  $p \approx 14 \text{ \AA}$ , es decir, el espesor de la bicapa y la separación entre los PPs (del Moral y Azanza, 1992).

5) la completa inhibición de la actividad bioeléctrica para un valor característico de CM estático,  $B_0$ , con una concordancia *razonablemente* buena entre la susceptibilidad diamagnética perpendicular al eje del PP o de la proteína canal,  $\chi_{\perp}$  (Fig. 24), medida por magnetometría SQUID (Azanza et al., 1993) y la obtenida experimentalmente de las medidas de la frecuencia a partir de los experimentos *fisiológicos* realizados (Azanza y del Moral, 1998).



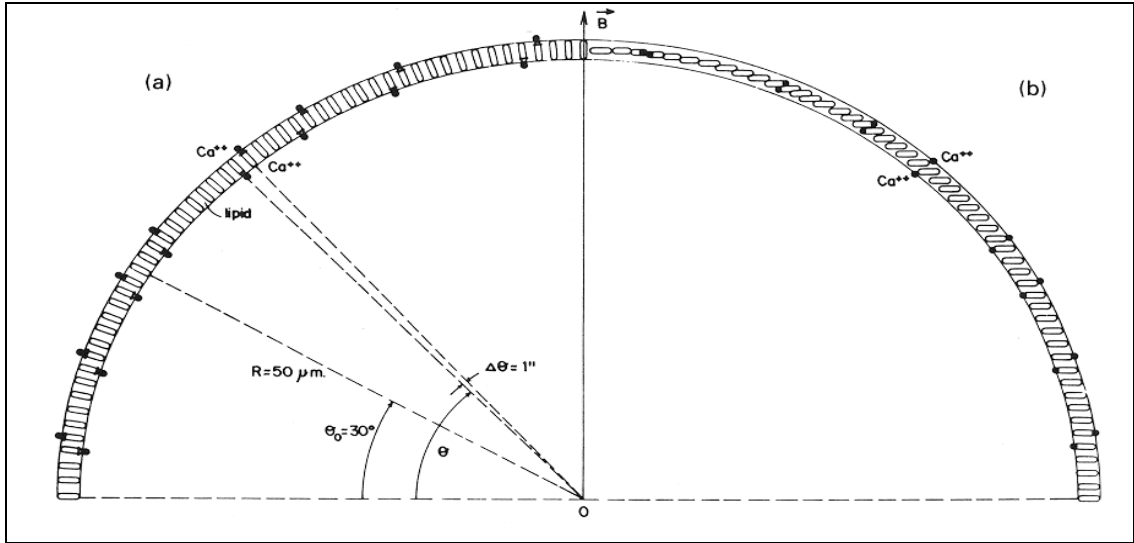


Fig.23.- (a) Esquema, no a escala, de la membrana neuronal mostrando las moléculas de lípido. Se muestran algunos fosfolípidos NN ( $\cong 2\%$  en nuestro modelo), con iones de  $\text{Ca}^{2+}$  enlazados. Se muestran la dirección del CM aplicado, **B**, así como el ángulo polar,  $\theta$ , de los ejes radiales de las moléculas de lípidos. Se muestra el ángulo  $\theta_0$  por debajo del cual no es posible la liberación de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la bicapa. (b) En la membrana bajo un CM aplicado **B** los PP diamagnéticos rotan y las cabezas cargadas de  $\text{Ca}^{2+}$  se aproximan, produciéndose así la explosión coulombiana de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando  $B = B_0$  (dado por [5] más adelante), los PPs se colocan ortogonales al campo (la situación mostrada en la mitad (b) de la figura), y la explosión es tan numerosa que la membrana se vacía de iones, produciéndose la abolición del impulso nervioso (ver Figs.26 y 36) (Azanza y del Moral, 1994).

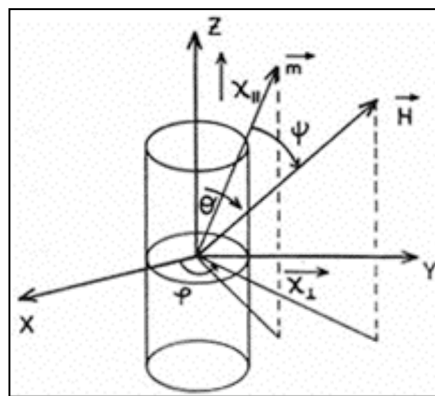


Fig.24.- Ángulo  $\theta$  formado por **H** con el eje OZ, energía anisotrópica con simetría cilíndrica, para un PP con simetría cilíndrica (Azanza y del Moral, 1994).

Uno de los problemas clave para comprender por qué los CEM de frecuencia extremadamente baja (ELF),  $f_M$ , y de baja intensidad (en un rango de 0,1 a 100 Gauss) son los campos relevantes que interaccionan con las neuronas, es proporcionar un modelo físico que explique dicho fenómeno. Este ha sido un problema elusivo desde el importante descubrimiento de la llamada “ventana en frecuencia” realizado por Bawin y Adey (1976). Estos autores observaron una reducción del eflujo de los iones de  $Ca^{2+}$ , a través de la membrana plasmática (en cortes de cerebro de pollo y gato in vitro), para frecuencias centradas alrededor de los 16 Hz, con un ancho de frecuencias de aproximadamente 25 Hz. La frecuencia de 16 Hz era la frecuencia de modulación de una portadora de alta frecuencia (450 MHz), que aparentemente fue irrelevante en la interacción de los CEM con las neuronas. Sin embargo, no estaba claro en aquel momento si el efecto era debido al campo eléctrico (CE) o al campo magnético (CM) asociados en el CEM cuasiestático de 16 Hz. Por esta razón realizamos nuestros experimentos iniciales en unas condiciones de diseño tales que nos permitieran separar los dos componentes, CE y CM, y determinar así cual de ellas era la principal responsable de la interacción de los CEM de ELF con los sistemas biológicos estudiados. Con este fin iniciamos nuestra investigación aplicando campos magnéticos estáticos ( $f_M = 0$ ), es decir CM puros (Azanza y del Moral, 1988). Los principales resultados obtenidos fueron: 1) una disminución considerable de la frecuencia de disparo (por hiperpolarización) en un alto porcentaje de las neuronas estudiadas con el incremento de la intensidad del CM estático aplicado desde  $\approx 1$  G (0,1 mT) hasta 5,4 kG (Figs. 25 y 26); 2) una inhibición abrupta, de la actividad neuronal para campos de  $B_0 \approx 5,7-7,3$  kG (Azanza y del Moral, 1995 a y b) (Figs. 26 y 27); 3) una disminución progresiva de la amplitud de los potenciales bioeléctricos con el aumento de la intensidad del CM (Figs. 26 y 27); 4) pero también la activación de la actividad neuronal (por despolarización) en  $\approx 20\%$  de las neuronas estudiadas. Una vez desarrollado el modelo físico que explicaba dichos efectos, se iniciaron los experimentos bajo exposición a CM sinusoidal de ELF observándose: 5) una disminución de la frecuencia de disparo,  $f$ , con el aumento de la frecuencia del CM de ELF,  $f_M$ , para  $B$  constante (Fig.28); 6) la disminución de  $f_0$  con  $f_M$ , sigue un espectro  $f_0(f_M)$  de curva lorentziana, que también explica nuestro modelo (Fig. 29); una resonancia en la respuesta cuando  $f_M = f_0$  (del Moral et al., 2006). El modelo desarrollado para explicar los efectos observados bajo exposición a CM estático se ha extendido para explicar los efectos observados bajo CM de ELF.

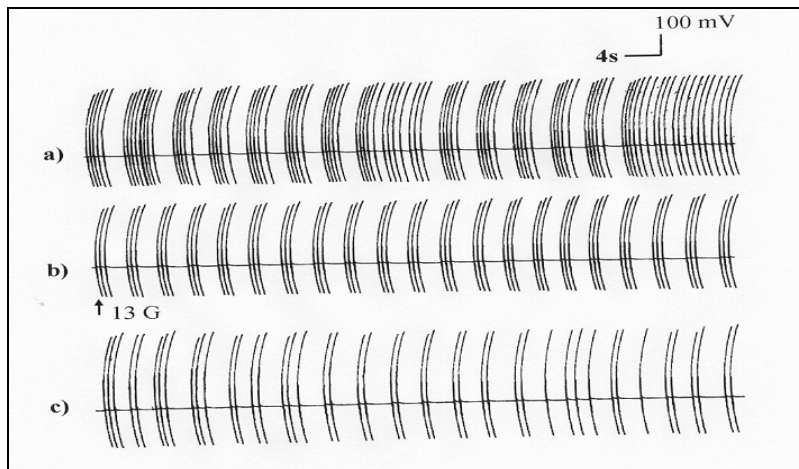


Fig.25.- Registro a) actividad bioeléctrica espontánea natural. Registros b y c), disminución progresiva de la frecuencia de disparo bajo exposición a CM estático de 13 G (del Moral et al.,2002).

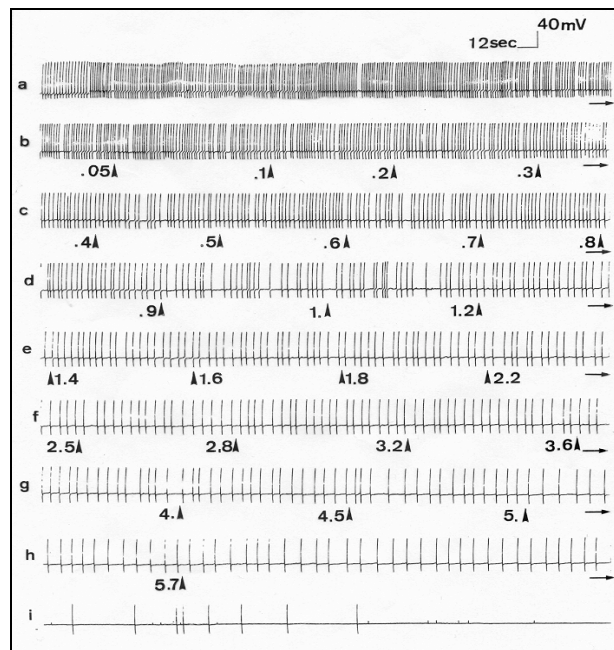


Fig.26.- La exposición a CM estático (0,05-5,7 kG) induce la disminución progresiva de la frecuencia de la actividad neuronal. Registro a) actividad espontánea. La intensidad del CM estático se aumentó progresivamente en pasos sucesivos de 1min de duración, a intervalos de 1 min (Azanza, 1993).

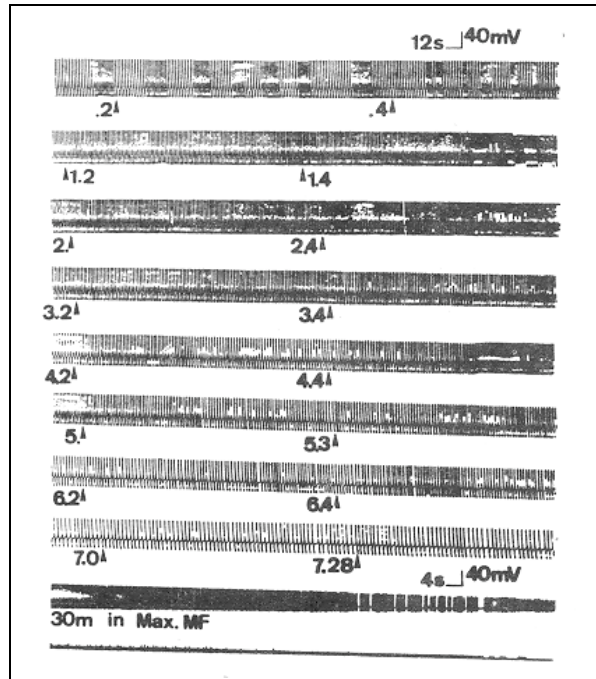
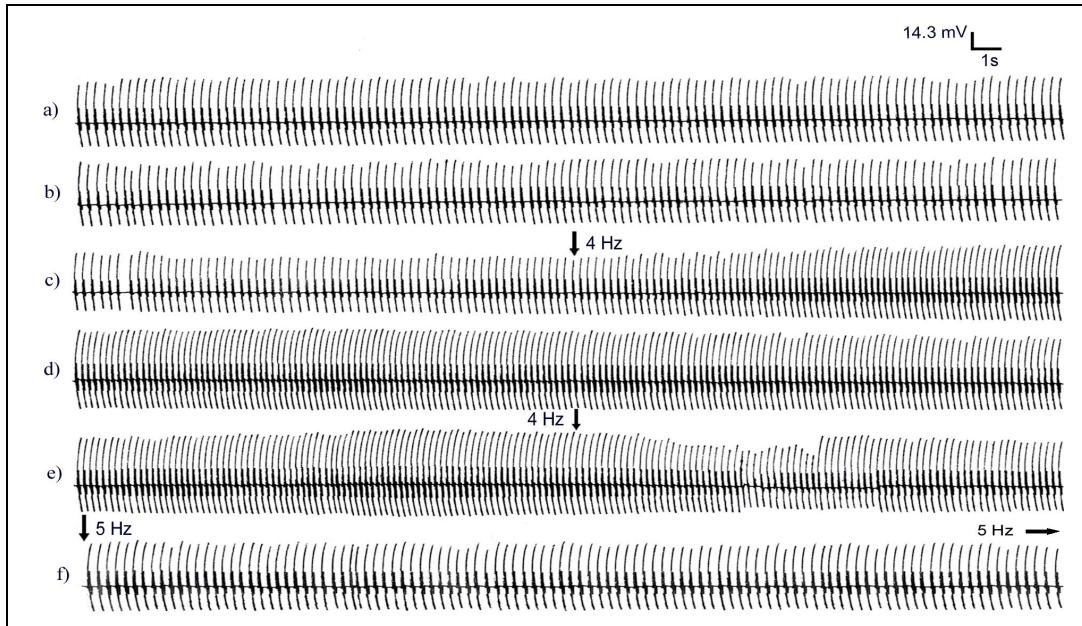
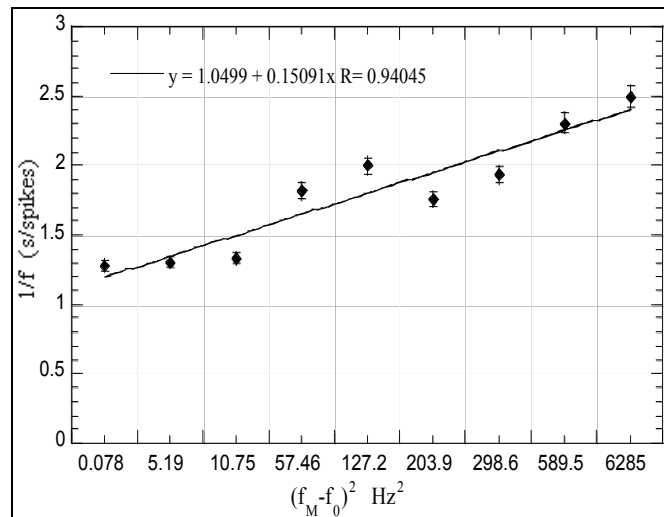


Fig.27.- El CM estático aplicado induce la disminución de la amplitud de los potenciales bioeléctricos. Los valores de intensidad del CM se expresan en kG. En los dos últimos registros se muestra la actividad después de 30 min de exposición a 7.2 kG, en que la amplitud de los potenciales se hace nula (Azanza y del Moral, 1995 b).

Con el fin de explicar los resultados obtenidos, hemos propuesto un modelo que proporciona una explicación cuantitativa del comportamiento de las neuronas bajo exposición a CM estático (del Moral y Azanza, 1992; Azanza et al., 1993; Azanza y del Moral, 1995 a y b), que se ha extendido para explicar los resultados de sincronización (del Moral et al., 2002; Azanza et al., 2002 a), los observados por exposición a CM sinusoidal de frecuencias desde 1 Hz hasta  $217 \text{ Hz} \approx 20\%$  y la disminución de la frecuencia de disparo con el aumento de la frecuencia del CM sinusoidal aplicado, de amplitud constante, que muestran efectos tipo “resonancia” cuando ambas frecuencias son coincidentes ( $f_M \approx f$ ) (Pérez Bruzón et al., 2004). El modelo propuesto explica estos últimos resultados suponiendo una captura resonante (curva lorentziana, Fig.29) de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  por las proteínas canal, cuya configuración se puede modificar en alguna medida, debido a las fuerzas de Lorentz del CM sinusoidal aplicado (del Moral et al., 2006).



A



B

Fig.28.- Experimentos realizados bajo exposición a CM de ELF (1 mT,  $f$  variable de 2 a 80 Hz). A) Los registros a) y b) muestran la actividad espontánea de la neurona D4 ( $f_0 = 4,2$  potenciales/s); en c) bajo campo aplicado de  $f_M = 4$  Hz la amplitud de los potenciales aumenta ( $\approx 30\%$ ) y la frecuencia aumenta a 5,6 potenciales/s; en f) se muestra que bajo CM de  $f_M = 5$  Hz, la amplitud de los potenciales vuelve a su valor inicial y la frecuencia disminuye a 4,6 potenciales/s. La respuesta neuronal indica un efecto de “ventana en frecuencia”. En B) se ha representado para la neurona V7,  $1/f$  frente a  $(f_M - f_0)^2$ , con frecuencia espontánea de  $f_0 \approx 0,7$  potenciales/s. A partir de la pendiente de la recta se ha calculado que  $\Delta f = 2,6$  Hz (Pérez Bruzón et al. 2004). La buena linealidad observada indica que la dependencia  $f(f_M)$  es de tipo lorentziano, es decir, de la forma  $\omega(\omega_M) = \omega_0 / \left[ (\omega_M - \omega_0)^2 + (\Delta\omega/2)^2 \right]^{1/2}$ , donde  $\Delta\omega = 2\pi\Delta f$  es la anchura de la curva lorentziana, con máximo en  $\omega_M = \omega_0$  (resonancia de la frecuencia) (del Moral et al., 2006).

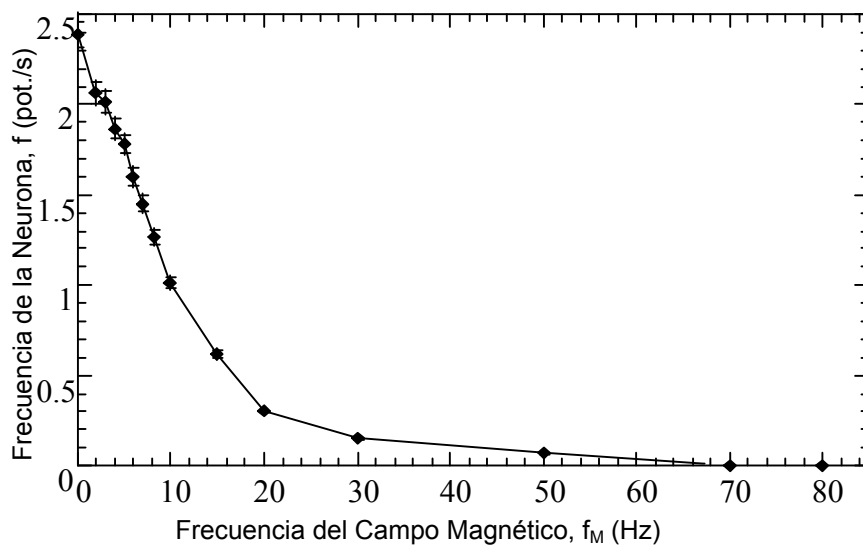


Fig.29.- Se representa la variación de la frecuencia de disparo,  $f$ , expresada en potenciales/s, en función de la frecuencia del CM sinusoidal,  $f_M$ , expresada en Hz. La frecuencia de la actividad espontánea es  $f_0 \approx 2.4$  pot./s. Se aplica un campo magnético de 1mT de frecuencia variable en el rango de 2 a 80 Hz. Cada valor de  $f_M$  se aplicó durante 1min. La ventana de frecuencia HMHW es  $\Delta f = 8$  Hz (Pérez Bruzón, 2004).

El modelo se basa en tres consideraciones fundamentales: 1) los iones de  $Ca^{2+}$  que son capaces de abrir los canales de  $K^+$ -dependientes del  $Ca^{2+}$ ; 2) la fuerte *anisotropía diamagnética* de los fosfolípidos (PPs) de la membrana (Fig. 24) y de las bombas de  $Na^+$ - $K^+$ -ATP-asas (ATPP); 3) el fenómeno de *superdiamagnetismo* por el cual los PPs actúan *cooperativamente*, es decir, formando grandes dominios correlacionados dentro del cristal líquido que es la membrana; 4) la liberación de iones de  $Ca^{2+}$  enlazados a los PPs por un mecanismo simultáneo de explosión culombiana a *ambos* lados de la membrana plasmática.

#### 4.1.- Superdiamagnetismo de la membrana y explosión coulombiana del $Ca^{2+}$ .

El modelo explica como se produce la liberación de los iones de  $Ca^{2+}$ , desde los puntos de enlace en la membrana, cuando se aplica un CM estático, **B**. Las moléculas de fosfatidilserina (PS) en la hemicapa citosólica y los glicolípidos (GL) en la hemicapa extracelular, están negativamente cargados (-e) en sus terminaciones polares (Fig.22) siendo capaces de capturar iones de  $Ca^{2+}$  en los medios citosólico y extracelular respectivamente. Se supone una neurona de morfología esférica (Fig.23), aspecto muy próximo a la realidad

(Fig.5). Las moléculas de PP presentan una fuerte anisotropía *diamagnética*, es decir, la susceptibilidad magnética paralela al eje mayor del PP,  $\chi_{||}$ , es muy diferente a la perpendicular,  $\chi_{\perp}$ , siendo la anisotropía de la susceptibilidad:  $\Delta\chi = \chi_{||} - \chi_{\perp} = -(2.8 \pm 0.10) \times 10^{-6}$  SI unidades, de acuerdo con las medidas de magnetometría SQUID obtenidos en membranas de eritrocitos humanos (Azanza et al., 1993). Un aspecto importante es que incluso un CM estático máximo aplicado de  $B = 0.7$  T es incapaz de liberar un ión de  $\text{Ca}^{2+}$  de su sitio de enlace, por lo tanto se necesita algún tipo de formación de clústeres de PPs, es decir, considerar un estado *cooperativo* denominado *superdiamagnetismo* (Azanza y del Moral, 1994). Puesto que los PPs no tienen momento dipolar eléctrico apreciable, la interacción de los PPs debe ser cuadrupolar eléctrica, como se da en los cristales líquidos esmécticos (Chaikin y Lubensky, 1995). No obstante, nuestros resultados experimentales recientes indican que las uniones gap pueden potenciar la formación de clústeres que se extienden a las membranas de varias neuronas. Las imágenes obtenidas de microscopía electrónica muestran una gran densidad de membranas que son expansiones de las células de glía rellenando los espacios entre las neuronas (Figs.17 A y B) así como en los troncos nerviosos rodeando los axones de diversos calibres (Fig. 30). Esta estrecha superposición de membranas es un dato morfológico que apoya el modelo de formación de grandes clústeres extendiéndose a las membranas de varias neuronas.

Nótese que por la formación de imágenes eléctricas de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la membrana, esta debe ser sustituida por una bicapa con cargas efectivas  $\delta_{\text{eff}}^+ = (2\epsilon_r / (\epsilon_r + \epsilon_r'))e$ , donde  $\epsilon_r' \cong 80$  y  $\epsilon_r = 2.21$  son respectivamente las constantes dieléctricas de las moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$  solvatado por agua y del colesterol (Fig.22). Esto reduce fuertemente la carga efectiva de  $\text{Ca}^{2+}$  enlazado a PS y GL a  $\delta_{\text{eff}}^+ = 0.053$  e (Fig.31), lo que tiene una importante repercusión en la fuerza de repulsión coulombiana entre los  $\text{Ca}^{2+}$ .

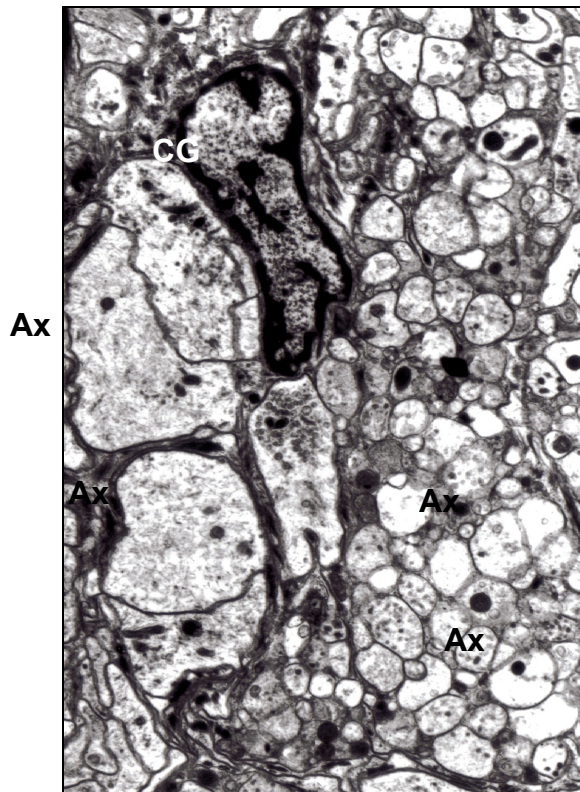


Fig.30.- Imagen de microscopía electrónica, (4000x). Corte transversal de un tronco nervioso con axones (Ax) de diversos calibres. Obsérvese el núcleo de una célula de glía (CG) y como las prolongaciones citoplasmáticas se extienden rodeando a los axones completamente (Calvo et al., 2003).

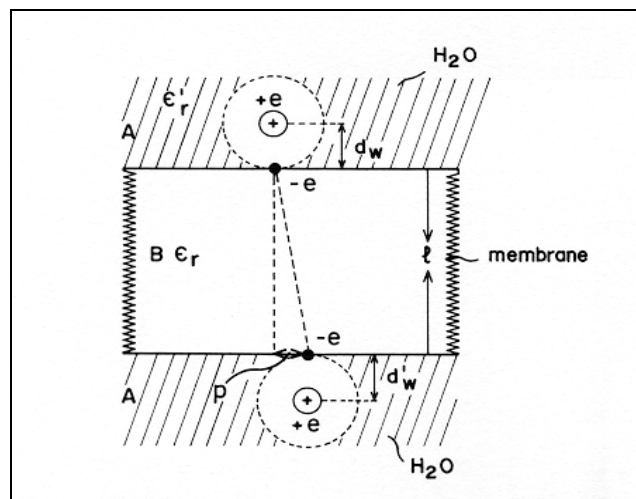


Fig.31.- Esquema para el cálculo de las cargas efectivas,  $\delta_{eff}^+$ , de los iones de  $Ca^{2+}$ , así como la carga de los ligandos polianiónicos de la superficie de la membrana  $\delta_{eff}^-$ , debido al efecto de las imágenes eléctricas formadas dentro de la membrana, que reaccionan sobre los iones de  $Ca^{2+}$  y las cargas enlazadas ( $d_w \cong 10 \text{ \AA}$  y  $d_w' \cong 3 \text{ \AA}$ ) (del Moral et al., 2002).



La principal característica del modelo es la siguiente. Cuando un CM estático,  $\mathbf{B}$ , se aplica a la neurona, puesto que  $\Delta\chi < 0$  los PPs rotan fuera de las líneas de  $\mathbf{B}$ , y para un campo lo suficientemente elevado,  $B_0$ , (Fig.23a), se ponen ortogonales a  $\mathbf{B}$  (Fig.23b). La situación para la rotación de las proteínas es la opuesta, pues  $\Delta\chi > 0$ , y por tanto, tratan de disponerse con sus ejes paralelos con  $\mathbf{B}$  (ver la Fig.32 donde se ha esquematizado una proteína de ATP-asa, ATPP, embebida dentro del cristal líquido de PPs). Si los PPs cargados con  $\text{Ca}^{2+}$ , a ambos lados de la membrana, están dispuestos como NN, con probabilidad  $\cong 2\%$  (Fig.23), existe una probabilidad de  $\_$  de que la rotación de los PPs se produzca en sentidos opuestos. De este forma los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  NN se aproximan uno al otro y, si la fuerza de Coulomb es suficientemente fuerte para romper el enlace iónico de energía de enlace  $\mathcal{E}_b$  (esto es posible porque las constantes dieléctricas  $\epsilon_r \ll \epsilon_r'$ , como se ha indicado anteriormente), los iones de calcio serán liberados mediante un mecanismo de explosión coulombiana cooperativa a ambos lados de la membrana. Nótese que los PPs del clúster rotan por un proceso tipo “dominó” y el espesor de la membrana eventualmente disminuirá (ver Fig.23 b).

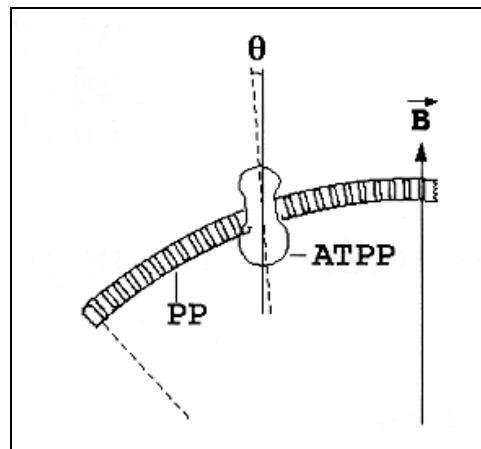


Fig.32.- Bicapa de PPs de la neurona con una proteína bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATP-asa (ATPP).  $\theta$  es el ángulo del eje de la ATPP con el campo magnético  $\mathbf{B}$  (Azanza y del Moral, 1996).

#### 4.2) Energética y liberación de $\text{Ca}^{2+}$

En la Fig.33 B se muestra la posición límite (final) cuando los PPs cargados de  $\text{Ca}^{2+}$ , dispuestos como NN, han rotado total y rígidamente quedando más próximos que en el resto de las posiciones intermedias (en particular la inicial). La variación relativa de la energía de

repulsión coulombiana es  $(\epsilon_f - \epsilon_i) / \epsilon_i = (p/l) \sin \theta$ , correspondiente a las distancias inicial,  $d_i$ , y final,  $d_f$ , entre los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  NN opuestos. Los iones enlazados a la membrana serán estables si  $\epsilon_i < \epsilon_b$ , siendo  $\epsilon_b$  la energía del enlace iónico. Por otra parte, la explosión coulombiana y la liberación de iones ocurrirá si  $\epsilon_f \geq \epsilon_b$ , lo que lleva a la condición  $\sin \theta \geq r_b (l/p) > 0$ , donde  $r_b \equiv (\epsilon_b / \epsilon_i) - 1$ . De aquí deducimos que hay un ángulo *umbral*  $\theta_0$ , solo por encima del cual puede producirse la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.23). Si tomamos un valor intermedio  $\epsilon_b / \epsilon_i$ , i.e. cuando  $d_f/d_i = 0.89$ , entonces  $\theta_0 \approx 30^\circ$  lo que significa que la explosión coulombiana puede ocurrir en un casquete esférico de  $\approx 120^\circ$  alrededor de **B**, es decir, en el 67% de la membrana completa. Las moléculas de PS y GL representan el  $\approx 14\%$  y el  $\approx 15\%$  de los lípidos en las hemicapas de la membrana interna y externa respectivamente. A partir de estas consideraciones esperamos la liberación de  $\approx 0.7$  iones de  $\text{Ca}^{2+}/100$  PPs en el citosol, lo que produce un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  de  $\approx 2 \times 10^3 \text{ Ca}^{2+}/\mu\text{m}^3$ . Este resultado es notable porque dicha variación de concentración representa un incremento de  $\approx 10$  veces la concentración normal (de menos de  $100 \text{ Ca}^{2+}/\mu\text{m}^3$ ) y es *grosso modo* del mismo orden de magnitud del necesario para producir la despolarización. No obstante, obsérvese que esto es para la situación límite (o a campo  $B_0$ ).

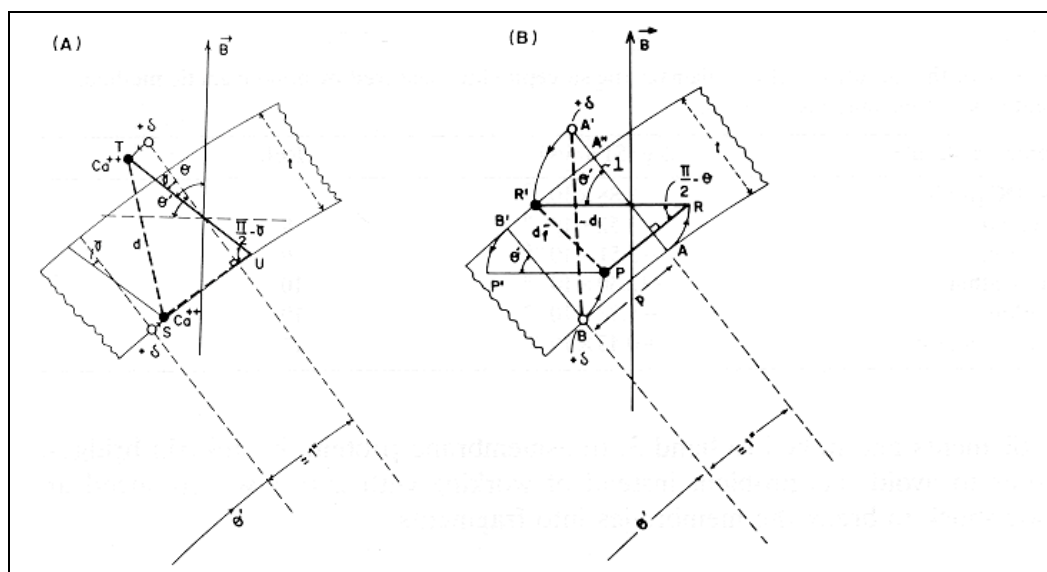


Fig.33.- A) Posición intermedia (arbitraria) de los dipolos diamagnéticos de lípidos cargados NN para campo magnético aplicado  $B < B_0$  y donde los dipolos ( $+\delta^+$ ) han rotado un ángulo  $\gamma$  bajo el par de fuerzas  $\Gamma$ . B) Posiciones iniciales a campo cero,  $BB'$  y  $AA'$ , para dos PP “activos”; bajo aplicación del CM de depleción,  $B_0$ , los dipolos han rotado totalmente un ángulo  $\theta$ .  $d_i$  y  $d_f$  son las distancias inicial y final entre los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para un campo  $B < B_0$  los PPs no alcanzan la ortogonal a  $\vec{B}$  y la liberación de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  es inferior (del Moral y Azanza, 1992; del Moral et al., 2002).

Resulta ahora interesante estimar las energías que participan en el proceso de liberación de los iones, situación muy delicada y compleja. La energía inicial de repulsión coulombiana es  $\varepsilon_i = (1/4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0)(\delta_{\text{eff}}^2/d_i) \cong 5.2 \text{ meV}$ , lo que da un límite superior a la energía de enlace  $\varepsilon_b = 6.4 \text{ meV}$  (tomamos  $\varepsilon_r = 2.21$  para el PP). Este valor puede parecer una energía pequeña para un enlace iónico, pero tenemos que considerar la fuerte reducción, de las cargas (+e) del  $\text{Ca}^{2+}$  por las cargas (-e) del NANA y de la PS (disminuyen a  $\delta_{\text{eff}} = 0.053 e$ ). El cálculo muestra que el radio medio de los grupos cargados negativamente enlazantes del  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig 22) es donde

$$R^- = \frac{1}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0} \frac{2e^2}{\varepsilon_b} - R_{\text{Ca}^{2+}} \quad [1]$$

$\varepsilon_r \cong 80$  para el agua de solvatación y  $R_{\text{Ca}^{2+}} \cong 3 \text{ \AA}$ . Sustituyendo  $\varepsilon_b$  en la eq.[ 1] se obtiene que  $R^- = 3.5 \text{ \AA}$  que es precisamente el radio del NANA. Se podría argumentar que  $\varepsilon_b$  es más pequeña que la energía de fluctuación térmica  $k_B T/2 \cong 13 \text{ meV}$  a 300 K para un grado de libertad de la rotación molecular. Pero es preciso tener en cuenta la tensión superficial de agua presionando sobre los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  solvatados,  $\varepsilon_\gamma = \gamma \pi R_{\text{Ca}^{2+}}^2$ , donde  $\gamma = 0.02 \text{ Jm}^{-2}$  para la interfase agua-aceite de oliva. Esto da  $\varepsilon_\gamma \approx 4 \text{ meV}$  que sumado a  $\varepsilon_b$  prácticamente contrarresta la energía de agitación térmica. Es de subrayar la estrecha consistencia de estos detallados cálculos.

La energía magnética de una molécula diamagnética en un campo aplicado de intensidad H es  $E_M = -(1/2) V\mu_0 H \cdot \tilde{\chi} \cdot H$ , donde  $\tilde{\chi}$  es el tensor de susceptibilidad magnética que para una molécula con simetría cilíndrica (caso aproximado de los PPs) tiene componentes,  $\chi_{||}$ , paralelo al eje de la molécula (eje OZ) y  $\chi_{\perp}$  a lo largo del radio de la molécula (ejes OX, OY) (Fig.24). V es el volumen del PP. A partir de la ecuación anterior es muy fácil demostrar que la energía magnética es

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

donde  $\theta$  es el ángulo formado por  $\mathbf{H}$  con OZ, teniendo esta energía simetría cilíndrica. Claramente cuando  $\Delta\chi < 0$ , se alcanza el mínimo de energía cuando el eje de la molécula es perpendicular a  $\mathbf{B}$ , resultando paralelo para  $\Delta\chi > 0$ . Estos son respectivamente los casos para un PP (Fig.22) y para una proteína canal o bomba de intercambio de iones (Fig.32) de la membrana, como se ha indicado más arriba. El par de fuerzas ejercido por  $\mathbf{B}$  sobre el momento diamagnético inducido  $m_d$ , es  $\Gamma = -\partial E_M / \partial \theta$  y a partir de la ecuación [2] se obtiene fácilmente  $m_d$ . Si calculamos la media térmica  $\langle m_d \rangle$  utilizando la estadística de Boltzmann y suponiendo pequeños valores del parámetro  $\lambda$  (ver más adelante donde se introduce) obtenemos un momento magnético por *clúster*  $M_c = \chi_r H$ , donde  $\chi_r = (1/2)N_c V \Delta\chi = \Delta\chi/2$  es la susceptibilidad rotacional y  $N_c$  el número de PPs en el clúster. Se ha comprobado que la predicha variación lineal de  $M_c$  con H concuerda bien (ver Fig.33) con la medida de la imanación de membranas de eritrocitos humanos liofilizados, que da  $\chi_{\text{meas}} = - (14 \pm 0.5) \times 10^{-7}$  SI.

La susceptibilidad total es por tanto  $\chi_{\text{meas}} = \chi_r + \chi_{\perp} = \Delta\chi/2 + \chi_{\perp}$ . Precisando más, el momento magnético del cluster es  $M_c = ((N_c V \Delta\chi/2) (1 - \exp(-\lambda^2) / \lambda I_0(\lambda)))H \equiv (N_c V \Delta\chi/2) I_{\text{er}}(\lambda)H$ , donde  $I_{\text{er}}(\lambda)$  es la función error y

$$\lambda \equiv B(N_c V |\Delta\chi| / 2 k_B T)^{1/2}. \quad [3]$$

Si tomamos un valor consistente de  $\lambda = 0.1$  y  $B = 0.3$  T, representativo de nuestros experimentos fisiológicos, obtenemos clústeres de PPs correlacionados de  $N_c \approx 5 \times 10^6$  PP, lo que significa  $\approx 5 \times 10^3$  clústeres por neurona, un número ciertamente elevado. Sin embargo, solo un número  $N_p$  de los  $N$  PPs en la membrana están cargados con iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (fracción  $p$ ) y están dispuestos, además, como NN (fracción  $q$ ), que son las condiciones necesarias para liberar  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol (Figs. 25 y 26 y ver §4.3, más adelante). A partir de los valores obtenidos de  $N_p/N_c$  (Tabla 2) deducimos que el número de PPs “activos” (pudiendo liberar  $\text{Ca}^{2+}$ )  $N_p$  es de solo  $\approx 1/30$  del volumen total de una neurona una neurona de tipo medio de  $\approx 100 \mu\text{m}$  de diámetro es  $\approx 1.6 \times 10^{11}$  (Azanza y del Moral, 1994).

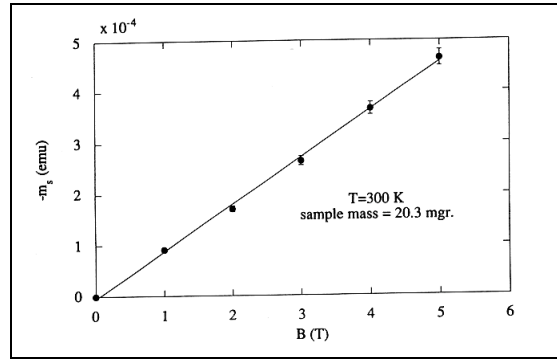


Fig.34- Dependencia del momento magnético medido en muestras de membranas liofilizadas de eritrocitos humanos, frente al CM aplicado (a 300 K). A partir de la pendiente de  $m_s$  vs.  $B$  se ha obtenido la susceptibilidad magnética  $\chi_{meas}$  (Azanza et al., 1993).

Neuron	$B_0$ (T)	$N_p/N_c$ ( $\times 10^{-5}$ )	$ \chi_{\perp} $ ( $\times 10^{-7}$ )
I	0.558	1.4	0.87
II	0.575	1.5	0.38
III	0.570	1.5	0.38
IV	(0.550)	1.4	0.66
V	0.566	1.4	0.50

Tabla 2.- Valores del campo de depleción  $B_0$ ; cociente  $N_p/N_c$  y  $|\chi_{\perp}|$  para las membranas de las neuronas obtenidos a partir de la medida de dependencia de la frecuencia  $f$  de disparo de la neurona con el campo magnético aplicado (ver Fig.34) (Azanza y del Moral, 1995 a).

En cualquier posición intermedia en la rotación de los PPs (Fig. 26a) las energías de repulsión magnética y electrostática se contrarrestan lo que se expresa por la relación  $V N_c E_M = (\epsilon_i - \epsilon_c(\gamma)) N_p$ , donde  $\epsilon_c(\gamma)$  es la energía de repulsión coulombiana para un ángulo de rotación  $\gamma$  (Fig.26 a) y  $\epsilon_i$  la energía de repulsión inicial. Haciendo el par de fuerzas  $\Gamma = d\epsilon/d\gamma = 0$  obtenemos la condición de equilibrio

$$\text{sen}2(\theta_B - \gamma)/\cos \gamma = B_0/B \quad , \text{ donde} \quad [4]$$

$$B_0 = (\mu_0 \delta_{\text{eff}}^2 p N_p / 2V \pi \epsilon_r \epsilon_0 |\Delta\chi| N_c l^2)^{1/2} \quad [5]$$

donde  $B_0$  es el *campo de depleción*, específico para cada neurona, tal que si  $B > B_0$ , los PPs se pondrán perpendiculares a  $\mathbf{B}$  (Fig.23 b) produciéndose la liberación de *todos* los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este es el campo para el que se ha encontrado experimentalmente que la frecuencia de

disparo es inhibida (Fig.36). La transición es muy abrupta (o de primer orden) (ver Fig.36). A partir de  $B_0$  y de la ec.[5] es de donde hemos obtenido el cociente  $N_p/N_c$  de la Tabla 2, para distintas neuronas.

#### 4.3.- Dependencia (decrecimiento) de la frecuencia de disparo de la neurona con el campo magnético.

La suposición anterior de la rotación completa y el no considerar la rotación de los fosfolípidos y proteínas estando asistida por fluctuaciones térmicas son simplificaciones dentro del modelo desarrollado hasta aquí. Con estas dos importantes modificaciones vamos a calcular finalmente nuestro principal objetivo, es decir, la dependencia de la frecuencia de disparo con el campo aplicado. En la Fig.35 se esquematiza la barrera *dinámica* de Peierls,  $\Delta E_c$  que tiene que ser superada por el complejo  $Ca^{2+}$ -PP para pasar de la posición “inicial”  $\theta_B = \theta_0$  a la “final”  $\theta_B = \theta$  para un campo aplicado,  $\mathbf{B}$  ( $\gamma = \theta - \theta_0$ ) (Fig.33A).

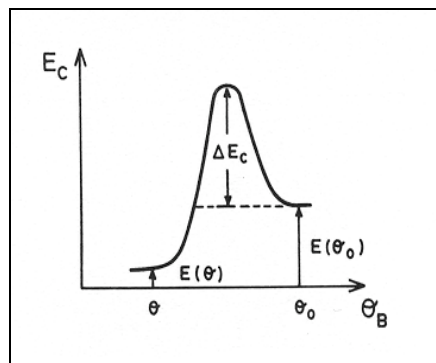


Fig.35.- Representación esquemática de la energía de los clústeres de PP-cabezas cargadas de  $Ca^{2+}$  frente al ángulo,  $\theta_B$ , formado por el clúster de moléculas rotadas de PP con el campo aplicado  $\mathbf{B}$ .  $\varepsilon(\theta_0)$  y  $\varepsilon(\theta)$  son las energías del clúster en el estado “inicial” ( $\theta_B = \theta_0$ ) y “final” ( $\theta_B = \theta$ ) para un ángulo de rotación del clúster  $\gamma$ . Una barrera de energía  $\Delta E_c$  tiene que superarse, la cual cambia su valor con  $\theta_0$ .  $\theta_B$  es el ángulo genérico del dipolo del PP con  $\mathbf{B}$  (del Moral et al., 2002).

La energía total de los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -PP es

$$\varepsilon(\theta_B) = \varepsilon_b + \varepsilon_c(\gamma) - \frac{B^2 V}{2\mu_0} (\chi_{\perp} + \Delta\chi \cos^2 \theta_B) \quad [6]$$

Un ion de  $\text{Ca}^{2+}$  se liberará cuando  $\varepsilon(\theta_B) = \varepsilon_b$ , de forma que la barrera de energía que ha de ser superada por el clúster de PP- $\text{Ca}^{2+}$  es  $\Delta E_c = N_c V \left( \frac{B^2}{2\mu_0} (\chi_{\perp} + \Delta\chi \cos^2 \theta_0) - N_p \varepsilon_c(\theta_0) \right)$ , donde, de nuevo,  $N_c$  es el número total de PP en el clúster y  $N_p$  el de los “activos” (NN).  $\Delta E_c$  varía a lo largo de la membrana. A temperatura T el número de iones  $\text{Ca}^{2+}$  liberados por clúster en la posición  $\theta$  es, de acuerdo con la estadística de Boltzmann

$$N_{\text{Ca}^{2+}}^c(\theta_0) = N_p \exp \left[ - \frac{\Delta E_c(\theta_0)}{k_B T} \right] \quad [7]$$

La integración de la ecuación [6] sobre  $\theta_0$ , con el fin de considerar todos los clústeres de la membrana, da una liberación total de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde la superficie citosólica de la membrana,

$$N_{\text{Ca}^{2+}} = N_p I(\lambda) = N_p \exp \left[ - \left( \frac{N_c V \chi_{\perp}}{2\mu_0} B^2 - N_p \varepsilon_c(\theta_0) \right) / k_B T \right] \quad , \quad [8]$$

donde  $I(\lambda) = (4\pi/\lambda) I_{\text{er}}(\lambda)$ , siendo la última la función error. Se ha observado experimentalmente que la frecuencia,  $f$ , de disparo de la neurona (Figs. 25 y 26) *disminuye* con el incremento de B. Este efecto se ha interpretado como, se ha dicho anteriormente, ser el resultado de las hiperpolarizaciones producidas en la membrana por el eflujo de iones de  $\text{K}^+$  a través de los canales de  $\text{K}^+$ -activados por  $\text{Ca}^{2+}$ . Ahora bien, la disminución del voltaje positivo de la membrana disminuye la probabilidad de disparo de la membrana y, por lo tanto, la frecuencia debe ser  $f = C/N_{\text{Ca}^{2+}}$ , (siendo C, una constante). De hecho, esto está corroborado por la ley química de acción de masas  $[\text{Ca}^{2+}][\text{P}_{\text{ch}}] = \kappa(T) [\text{Ca}^{2+} - \text{P}_{\text{ch}}]$ , donde  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $[\text{P}_{\text{ch}}]$ , y  $[\text{Ca}^{2+} - \text{P}_{\text{ch}}]$ , son las concentraciones del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico,  $\text{P}_{\text{ch}}$  la de las proteínas canales iónicos *abiertas*,  $\text{Ca}^{2+} - \text{P}_{\text{ch}}$  la del complejo y  $\kappa(T)$ , la constante de reacción. Por lo tanto, la expansión en serie de  $I_{\text{er}}(\lambda)$  en [8] para pequeño  $\lambda$  (o pequeño B), proporciona finalmente la variación de la frecuencia de disparo con B, resultado central de este modelo (del Moral y Azanza, 1992; Azanza y del Moral, 1994),

$$f(B) = f(0) \exp \left[ - \frac{N_c |\chi_\perp| V}{2\mu_0 k_B T} B^2 \right] \equiv f(0) \exp[-\alpha B^2] \quad [9]$$

donde  $f(0)$  es la frecuencia de disparo espontánea, natural, y  $\alpha$  es el parámetro relevante del modelo,

$$\alpha = \frac{N_c |\chi_\perp| V}{2\mu_0 k_B T} \quad [10]$$

Puede verse que  $\alpha$  depende de las propiedades físicas de la membrana. Obsérvese que para  $B = 0.7 \text{ T}$ ,  $\lambda = 0.045 \ll 4$ , el último valor siendo el necesario para una rotación completa de los PPs,  $\gamma = \pi/2$ . Por tanto, basta con campos débiles para producir una variación de frecuencia, como nuestros experimentos muestran (así con campos sinusoidales de  $0.3 \text{ nT}$  y  $f_M \cong 7 \text{ Hz}$  se ha observado el efecto, Maestú et al., 2006).

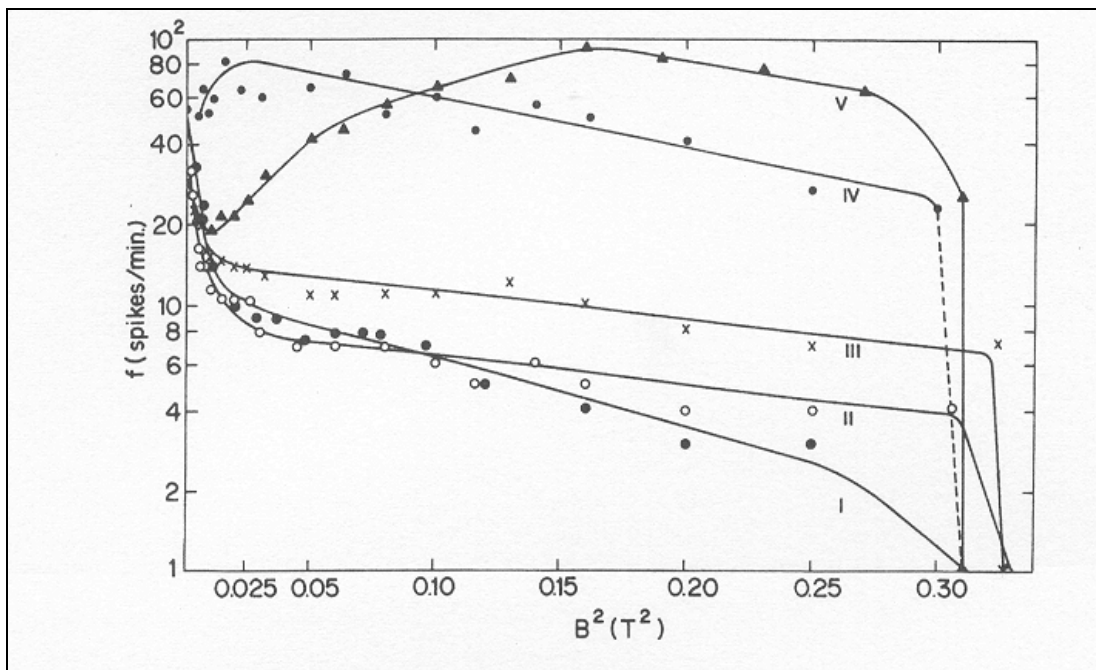


Fig.36.- Representación semilogarítmica de la frecuencia de disparo,  $f$ , de las neuronas frente a  $B^2$  para varias neuronas de los ganglios de *Helix aspersa*. La zona lineal más amplia confirma la ec. [9] del modelo para  $f(B)$ . La pendiente es el parámetro  $\alpha$ . Nótese variaciones también lineales a  $B$  más bajos, lo que indica valores de  $\alpha$  mucho mayores a campos muy débiles (posiblemente valores de  $N_c$  mucho mayores) (Azanza y del Moral, 1994).



Si comparamos las predicciones teóricas con los resultados experimentales mostrados en la Fig.36, vemos que la predicción se *cumple considerablemente bien*. Después de una variación inicial rápida, se produce un cruzamiento a una variación lineal, también importante, con  $B^2$ . La pendiente medida,  $\alpha$ , proporciona un soporte importante para nuestro modelo tal como sigue. Efectivamente, si tomamos  $N_c = 5 \times 10^6$  PPs/clúster, de acuerdo con los datos obtenidos de nuestras medidas anteriores, *independientes*, de la imanación de las membranas de los eritrocitos podemos obtener los valores de  $|\chi_{\perp}|$ , como se muestran en la Tabla 2, que son razonablemente próximos para todas las neuronas testadas, dado que  $\chi_{\perp}$  es una propiedad molecular del PP. Asimismo, de nuestras medidas *independientes* de susceptibilidad, hemos obtenido  $\Delta\chi = -(28 \pm 1) \times 10^{-7}$  SI (Azanza et al., 1993), mientras que los valores medios obtenidos de nuestros experimentos de fisiología, anteriores, dan  $\chi_{\perp} = -0.56 \times 10^{-7}$ , con lo que  $|\chi_{||}| \gg |\chi_{\perp}|$  como se debería esperar para las susceptibilidades diamagnéticas de una molécula similar a un bastón. Esta concordancia es realmente remarcable y proporciona un sólido apoyo a nuestro modelo.

#### 4.4.- El voltaje de despolarización disminuye bajo el CM aplicado

Esta disminución (véase Figs. 25 y 26) se puede explicar como una desensibilización de las proteínas, bombas- $3Na^+-2K^+$ -ATPasas (ATPP), debido a su reorientación bajo el campo aplicado  $\mathbf{B}$ , tratando de colocarse con su eje mayor paralelo a  $\mathbf{B}$ , alejada de su dirección natural radial, como se dijo anteriormente (Fig.32). Las ATPP están embebidas en el cristal líquido de la bicapa de PPs. En consecuencia, la superficie activa de la proteína disminuye bajo su rotación y la bomba pierde parte de su eficacia de hidrólisis del ATP y del bombeo de iones. Por lo tanto, la concentración citosólica de iones de  $Na^+$  aumenta, de ahí disminuye el gradiente transmembrana del  $Na^+$ , disminuyendo así el voltaje de despolarización (v.d). Las ATPP también muestran superdiamagnetismo anisotrópico, con energía diamagnética,  $E_M$  ( $N_a$  es el número de ATPP/clúster). El bombeo activo de iones saca cargas  $+e$  fuera de la célula dejando el interior de la membrana cargado negativamente. La

disminución de la carga transferida por un clúster de proteínas es así,  $\Delta q_d^c(B) \approx N_a e \exp(-N_a E_M / k_B T)$ . Si sumamos a todos los clústeres de ATPP,  $N_{pc}$ , y utilizamos el teorema de Gauss para evaluar el campo eléctrico dentro de la membrana debido a la carga negativa atrapada,  $\Delta q_d^c(B)$ , se obtiene que la disminución en el v.d. viene dada por la expresión

$$\Delta V_d(B) \cong - (4\pi/N_{pc}) \varepsilon_{fb} \exp(+\alpha B^2), \quad [11]$$

Donde, ahora  $\alpha = N_a \left| \chi_{\perp} \right| V_p / 2\mu_0 k_B T$ ,  $\varepsilon_{fb} \cong 7 \text{ mV}$  es la fem. de la bomba,  $V_p$  es el volumen de una ATPP, y  $\left| \chi_{\perp} \right| \cong -0.43 \times 10^{-6}$  para la misma (Azanza y del Moral, 1995b; 1996). En la Fig.37 hemos representado la disminución de v.d. frente a  $B^2$  para cuatro neuronas, observándose que la predicción se cumple correctamente. A partir de la pendiente  $\alpha$ , hemos obtenido los valores de  $N_a$  entre  $(0.15-5.9) \times 10^4$  para las cuatro neuronas estudiadas. Obsérvese que el número  $N_a N_{pc}$ , por neurona ( $N_{pc}$  entre 5-47) de ATPPs activos por membrana está correlacionado con los radios medidos de las neuronas. Sin embargo, la rotación de las ATPP pudiera estar limitada por el enlace con el citoesqueleto lo que reduciría el efecto de reorientación inducido por el campo  $B$ .

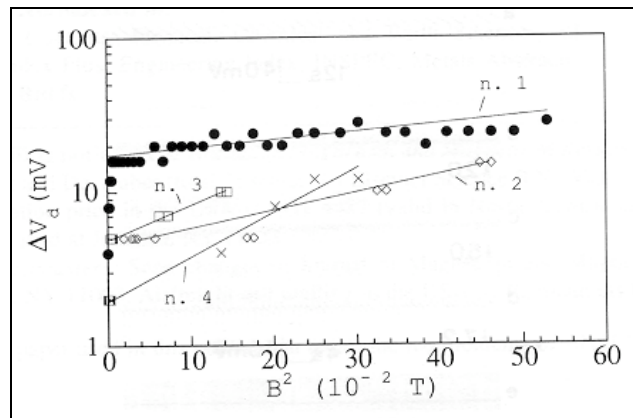


Fig.37.- Representación semilogarítmica de la *disminución* del voltaje de despolarización frente a  $B^2$  para cuatro neuronas estudiadas (Azanza y del Moral, 1996).

#### 4.5.- Campos magnéticos de frecuencia extremadamente baja (CM-ELF)

Los CM de ELF son importantes puesto que, como hemos observado, *la sensibilidad de las neuronas es mayor frente a los CM sinusoidales que frente a los CM estáticos*. Hemos

observado que hay una respuesta máxima cuando la frecuencia del campo aplicado está en el *rango de la frecuencia espontánea de disparo de las neuronas,  $f(0)$* . Si el CM aplicado es  $B = B_0 \cos \omega_M t$ , su sustitución en [9] da  $f(B) = f(0) \exp\{-\alpha B_0^2 \cos^2 \omega_M t\}$ , cuya media temporal es  $\langle f(B) \rangle \equiv f(0) \exp[-\alpha B_0^2 / 2]$ . Para los CM aplicados,  $\alpha B_0^2 < 0.02$ , lo que permite expandir la exponencial hasta  $B^2$ , y si  $f_M$  es  $\geq 1$  Hz o del orden de  $f(0)$  podemos introducir nuevamente la media temporal de  $B^2$ , obteniendo

$$f(B_0) \equiv f(0) \{1 - \alpha B_0^2 / 2\}, \quad [12]$$

en excelente acuerdo con la disminución con  $B_0^2$ , tal como se muestra en la Fig.38 para un par de neuronas. Nótese que en  $\langle f(B) \rangle$ ,  $\langle e_M \rangle = (1/2)(B_0^2 / 2\mu_0)$  es precisamente la densidad de energía media entregada a la membrana (aun cuando tratándose de un campo cuasiestático,  $\langle e_M \rangle$  es esencialmente almacenada, pero no disipada térmicamente. Es de destacar que bajo aplicación de CM-ELF las neuronas se sincronizan, como ya se ha demostrado en las Figs.11 y 12. A partir de las pendientes de las rectas de la Fig.38 encontramos que  $N_c \approx 10^{12}$  PP/clúster lo que significa que bajo el CM-ELF aplicado  $\approx 10$  neuronas se correlacionan. Esto significa que clústeres de PPs, de enorme tamaño, están actuando cooperativamente de alguna forma. Recuérdese que bajo campos estáticos encontramos hasta 5000 clústeres por cada neurona. Este aspecto se está considerando puntualmente. La ecuación [12] no proporciona ninguna dependencia con  $f_M$ . Sin embargo, hemos observado recientemente una disminución importante de  $f(B_0)$  con el incremento de la frecuencia del CM aplicado,  $f_M$ , para campos sinusoidales de amplitud tan baja como 3-6 G (1 G = 100  $\mu$ T), lo que sugiere algún tipo de fenómeno de *resonancia* en la captura de  $Ca^{2+}$ . Un modelo muy recientemente desarrollado (del Moral et al., 2006) indica que el espectro de frecuencias de disparo,  $\omega$ , varía con la frecuencia,  $\omega_M$  del campo ELF, de la forma,

$$\omega = \frac{\omega_0 \exp[-\alpha B_0^2 / 2]}{(\omega_0 - \omega_M)^2 + (\Delta\omega/2)^2} \quad [13]$$

Ésta es una observación muy importante, justificando el por qué los CM de ELF (0,1Hz-100 Hz) son los de más alta significación en la interacción de las células con los CM cuasiestáticos, dado que la resonancia de la *frecuencia* de disparo se produce cuando precisamente  $f_M = f_0$  (máximo de la lorentziana [13]). El buen acuerdo de la distribución lorentziana predicha en ec.[13] puede verse en la Fig.29 (Pérez Bruzón, 2005).

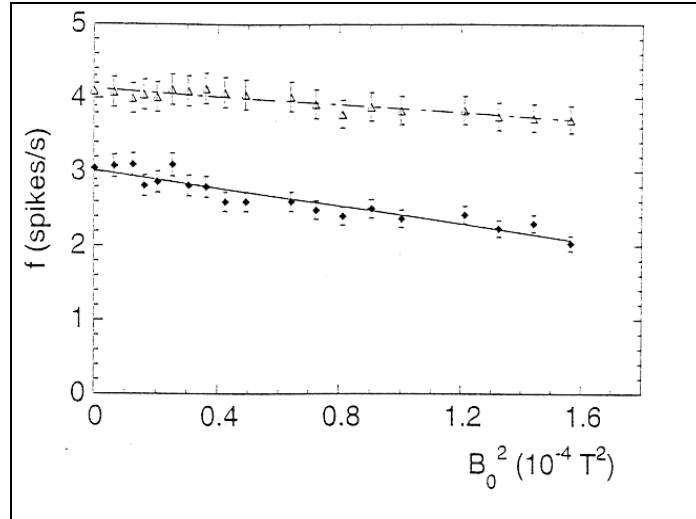


Fig.38.- Dependencia de la frecuencia de disparo con  $B_0^2$  para el par de neuronas V20 y V44 de los experimentos mostrados en las Figs.11 y 12 bajo exposición a CM de 50-Hz y  $B_0 = 1-150$  G (0.1-15 mT) (Azanza et al., 2002 a).

Por otra parte, la linealidad encontrada experimentalmente para la frecuencia de disparo con el campo  $B_0^2$  y con pendiente similar (Fig. 38), sugiere que la energía *magnética* media almacenada en las neuronas está *generalmente* también involucrada de alguna forma en el efecto de *sincronización*. Consideramos que este hallazgo experimental es altamente clarificador en el problema de la interacción del CM de ELF con la materia viva. En efecto, en el modelo que hemos propuesto, y como ya se ha dicho, toda la energía magnética almacenada en los PPs de las membranas (de volumen,  $N_c V \equiv V_m$ ) (eq. [8]), del clúster de *neuronas* correlacionado está involucrado en este efecto. Esta energía viene claramente dada por

$$E_t = - V_m (1/2) \langle M B \rangle = V_m (1/4 \mu_0) |\chi_{\perp}| B_0^2, \quad [14]$$

donde M es la imanación rotacional inducida en la membrana, es decir,  $M = \chi_{\perp} B / \mu_0$ , y  $\langle M B \rangle$ , el valor medio temporal (obsérvese que en la ec. [14], la susceptibilidad que aparece es  $\chi_{\perp}$  puesto que los PPs tratan de disponerse perpendiculares a  $\mathbf{B}$ ). La transferencia de energía desde un campo estático, o cuasiestático de ELF, a la neurona es *solamente* posible a través del mecanismo de la ec. [14] de interacción puramente *magnética*. Esto es así porque un campo *magnético* estático o cuasiestático,  $B(t)$ , *no* puede transferir energía cinética a una carga eléctrica móvil,  $q$ , de la membrana puesto que la fuerza de Lorentz,  $\mathbf{F} = q (\mathbf{v} \times \mathbf{B})$ , es perpendicular a la velocidad de la carga,  $\mathbf{v}$ . Esto se puede concluir asimismo dado que el valor medio de *potencia magnética* transferida a la neurona es nulo, es decir,  $\langle dE_d / dt \rangle = 0$ .

Realmente, la energía media transferida a las cargas *eléctricas* estadísticamente en reposo, debería considerarse despreciable excepto para un calentamiento por efecto Joule inespecífico, aleatorio y despreciable a las ELF. Nuestras consideraciones están sólidamente basadas en las ecuaciones de Maxwell para los campos electromagnéticos y en los principios de la termodinámica, y por consiguiente deben ser correctas.

Obsérvese que las actividades del EEG de humanos están en el rango de 1-80 Hz: ondas lentas: < 1Hz; ondas  $\delta$ : 1-4 Hz; ondas teta  $\theta$ : 5-7 Hz; ondas  $\alpha$ : 8-12 Hz; ondas  $\mu$ : 12-18 Hz; ondas  $\beta$ : 15-30 Hz y ondas  $\gamma$ : 30-80 Hz. Estas frecuencias coinciden con las frecuencias de muchos de los campos magnéticos presentes en nuestro medio ambiente cotidiano: red eléctrica (50 Hz), teléfonos móviles UMTS (2Hz y 100 Hz) y GSM (8,3 y 217 Hz) etc. Por lo tanto, nuestros resultados, obtenidos desde neuronas individuales, que demuestran un efecto de resonancia entre la frecuencia del campo magnético aplicado y la espontánea de la neurona, pueden ser considerados como altamente significativos. Nuestro sencillo modelo experimental de neuronas de molusco, puede tener perspectivas importantes en el estudio de la compleja dependencia de la frecuencia de la actividad específica neuronal con los campos magnéticos débiles de ELF. La capacidad de un campo magnético sinusoidal de ELF de facilitar la sincronización de la actividad de disparo de *redes* neuronales, similar a la que se observa de forma natural en el cortex visual de gato *in vivo* (Singer y Gray, 1995) y en el hipocampo de cerebro de rata *in vitro* (Jefferys et al., 1996), abre nuevas perspectivas experimentales y teóricas, ampliando así las fronteras del campo de los bioefectos inducidos por los campos magnéticos.

## **5.- PROYECCIÓN SOCIAL DEL BIOMAGNETISMO Y LA MAGNETOBIOLOGÍA**

Los resultados experimentales sobre los efectos biológicos inducidos por exposición a campos electromagnéticos (CEM) en el espectro completo de las radiaciones no ionizantes, desde los CM estáticos a las radiofrecuencias (RF), pasando por las frecuencias ELF, han adquirido una gran relevancia pública por la posibilidad de que, importantes por sus efectos, los CEM pudieran influir en la salud de la población humana. Las primeras inquietudes surgieron en relación con los trabajadores sometidos a la exposición a microondas en aplicaciones civiles y de defensa: telecomunicaciones, satélites, radares de todo tipo, hornos de calentamiento, aceleradores de partículas etc. Los primeros estudios serios se realizaron

por parte de los Ministerios de Defensa de la antigua Unión Soviética y de los Estados Unidos de América. De estos estudios resultaron las primeras Normativas de Seguridad que se establecieron en ambos países en la década de los años 70. A partir de la década de los 80, especialmente en la antigua Unión Soviética, se utilizaron como una modalidad terapéutica en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer (Erwin y Hurt, 1981). La inquietud se trasladaría a la población como consecuencia de la exposición a las redes de potencia eléctrica, en el rango de las frecuencias industriales (50-60 Hz). Más recientemente, la preocupación se ha extendido a la exposición a las antenas de las estaciones base de telefonía móvil, a las de los propios teléfonos móviles y a las RF emitidas por los radares y sistemas de telecomunicación en general. Objeto de especial interés son aquellas tecnologías que pueden suponer una exposición continuada por parte de los trabajadores y usuarios, como son los equipos de diagnóstico clínico por imagen mediante resonancia magnética (MRI), la estimulación magnética transcraneal, los trenes de levitación magnética, los sistemas de transporte electrificados, además de los laboratorios de investigación en campos magnéticos intensos, física de altas energías (cavidades de microondas y bobinas superconductoras) y reactores experimentales de fusión, además de procesos industriales diversos. En suma, vivimos en un mundo permeado por los campos magnéticos.

Los estudios experimentales realizados, se han considerado estar llenos de *incertidumbres*, lo que ha conducido, a efectos prácticos desde el punto de vista sanitario, a la aplicación del *principio de precaución*. Este principio tiene en cuenta los valores de frecuencia, densidad de potencia de emisión y tiempo de exposición (dosis), al que eventualmente puede estar expuesta la población humana, para los distintos equipos que emiten o funcionan con CEM en el rango no ionizante. Existe una gran controversia con respecto a los *límites* considerados como de *seguridad para la población*, aprobados en los diferentes países. De forma continuada se están actualizando los límites aconsejados de exposición (ICNIRP 1994, 2001; NRPB, 2004) No obstante, no hay acuerdo entre los países y los límites admitidos que, supuestamente, cumplen el citado principio de precaución, son muy amplios mostrando unos márgenes dispares. A medida que se profundiza en los estudios básicos experimentales se va comprobando que los límites exigibles deben ser cada vez más bajos. De ahí el extendido principio que propone que las emisiones *se mantengan en niveles tan bajos como sea posible* para permitir el funcionamiento de las diferentes tecnologías.

Lo relevante realmente en las radiocomunicaciones (radio y televisión) y telefonía móvil, es que la portadora de RF va *modulada* por la señal de baja frecuencia a transmitir. La onda portadora es la componente de *alta frecuencia*, que puede inducir *efectos térmicos*, dentro de unos determinados márgenes de potencia, en los sistemas biológicos sobre los que incide (TELECOM GSM, 1998). Las densidades de potencia de emisión, aceptados en las *Normativas* oficiales que regulan la emisión de ondas electromagnéticas, tratan de asegurar que no se induzcan efectos térmicos. No obstante, se están ignorando los efectos biológicos inducidos en condiciones *atérmicas*, ampliamente demostrados con la investigación básica, como hemos visto anteriormente, en el caso de las neuronas. La absorción de energía, por parte de una cierta masa de tejido, se mide en términos de Tasa de Absorción Específica, SAR (W/kg). Los valores de SAR se calculan sobre sistemas inertes, *fantomas*, esto es, un recipiente relleno de un líquido con la misma densidad que los tejidos biológicos. Estas medidas SAR entrañan un *falseamiento* de la realidad. Las medidas se obtienen desde un sistema inerte y, se aplican, a un sistema vivo. La sensibilidad de un organismo vivo es enorme, muy superior a la de cualquier artilugio inerte inventado por el hombre. Por su elevada frecuencia, en el rango de los 900 MHz (telefonía GSM, por ejemplo) la capacidad de penetración de las ondas EM en los tejidos es baja, del orden de 1 cm de profundidad en la piel, y, la profundidad a la que la densidad de potencia ( $W/m^2$ ) se hace el 1% de su valor en superficie es de 3 cm (Gérin et al., 1999). El campo magnético de ELF, de modulación, tiene intensidades comprendidas entre 0,01-5,2-20  $\mu T$  y densidades de potencia de 0,05 a 1  $mW/cm^2$  (Linde y Mild, 1997), y su capacidad de penetración en las estructuras orgánicas es total, como se ha explicado anteriormente. No obstante, se están ignorando los efectos biológicos demostrados experimentalmente con estos niveles de intensidad y densidades de potencia.

La vulnerabilidad del sistema nervioso frente a los CEM es uno de los pocos efectos biológicos reconocidos en los informes oficiales de la UE (*Recomendación del Consejo de 12 de Julio de 1999 relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos (0 a 300 GHz). 1999/519/CE.DOCE 30.7.1999.L199/59*). Debemos insistir en que los límites de exposición recomendados en el citado documento y, adoptados en nuestro país en el *Real Decreto del Ministerio de Ciencia y Tecnología de 28 de septiembre de 2001*, (Tablas 3 y 4, BOE 234, 29 Septiembre, 2001), definen niveles de *seguridad de exposición* frente a los posibles efectos térmicos.

Tabla 3

restricciones básicas para campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos (0 Hz-300 GHz)

Gama de frecuencia	Inducción magnética (mT)	Densidad corriente (mA/m <sup>2</sup> ) (rms)	SAR medio de cuerpo entero (W/kg)	SAR localizado (cabeza y tronco) (W/kg)	SAR localizado (miembros) (W/kg)	Densidad de potencia S (W/m <sup>2</sup> )
0 Hz 0-1 Hz 1-4 Hz 4-1000 Hz 1000Hz-100 kHz 100 kHz-10 MHz 10 MHz-10 GHz 10-300 GHz	40 ----- --	- 8 f/500 f/500 --	----- 0,08 0,08 -	----- 2 2 -	----- 4 4 -	----- - 10

*f es la frecuencia en Hz. (\*) Las restricciones básicas expuestas en el cuadro 1 se han establecido teniendo en cuenta las variaciones que puedan introducir las sensibilidades individuales y las condiciones medioambientales, así como el hecho de que la edad y el estado de salud de los ciudadanos varían.*

Tabla 4

niveles de referencia para campos eléctricos, magnéticos y electromagnéticos (0 Hz-300 GHz, valores rms imperturbados)

Gama de frecuencia	Intensidad de campo E (v/m)	Intensidad de campo H (A/m)	Campo B (mT)	Densidad de potencia equivalente de onda plana (W/m <sup>2</sup> )
0,1 Hz	—	3,2 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	-
1-8 Hz	10000	4 x 10 <sup>4</sup> /f <sup>2</sup>	4 x 10 <sup>4</sup> /f <sup>2</sup>	-
8-25 Hz	10000	4000/f	5000/f	-
0,025-0,8 kHz	250/f	4/f	5/f	-
0,8-3 kHz	250/f	5	6,25	-
3-150 kHz	87	5	6,25	-
0,15-1 MHz	87	0,73/f	0,92/f	-
1-10 MHz	87/f <sup>1/2</sup>	0,73/f	0,92/f	-
10-400 MHz	28	0,073	0,092	-
400-2000 MHz	1,375 f <sup>1/2</sup>	0,0037 f <sup>1/2</sup>	0,092	-
2-300 GHz	61	0,16	0,0046 f <sup>1/2</sup>	-
			0,20	-
				-
				2
				f/200
				10



Probablemente, al no considerarse los efectos biológicos de *naturaleza no térmica*, demostrados experimentalmente, no se han incluido límites de seguridad para estas circunstancias de exposición, más realistas que los reflejados. Los límites expresados han sido validados por la UE, concluyéndose que *no existe suficiente evidencia para proponer nuevas restricciones en los niveles de exposición recomendados*. Es necesario resaltar que cuando se propusieron los niveles del documento de 1999, no se tenía el conocimiento del que ahora disponemos, relativo a los valores *reales* de intensidades de campo y densidades de potencia que de forma habitual se están emitiendo al ambiente.

En Julio de 2001, la *Agencia Internacional de Evaluación del Cáncer* (OMS) incluyó los CEM de ELF en la categoría de *posibles carcinógenos humanos, grupo 2B de agentes tóxicos*. Dice textualmente: “.. *la exposición crónica a campos magnéticos de ELF, por encima de 0,3  $\mu T$ , puede incrementar por un factor de 2 la incidencia de leucemia en niños*”. De acuerdo con esto, cabe pensar: 1) que no estamos *totalmente* protegidos frente a los efectos térmicos y es preciso revisar los niveles de exposición oficiales, rebajándolos en la medida tecnológicamente posible; 2) que hay que tener en cuenta los efectos de naturaleza no térmica y definir los niveles de campo magnético y los límites de exposición temporal; 3) que tengamos que renovar en profundidad los conceptos, hasta ahora aplicados, en la evaluación de riesgos frente a la exposición de ondas radioeléctricas y campos electromagnéticos de *frecuencia extremadamente baja*.

Desde su inicio, este campo de investigación ha sido muy controvertido. Las condiciones de experimentación entre grupos diferentes, en laboratorios diferentes, difícilmente son homogéneas lo que hace compleja la replicación de los resultados observados. Otro de los problemas que se han señalado es que el campo magnético terrestre (CMT) o cualquier CEM de ELF ambiental son de “muy baja intensidad” por lo que se ha considerado que *no podían* producir efecto biológico alguno. No obstante, para responder a esta cuestión es preciso conocer el rango de intensidades de los campos magnéticos endógenos, producidos como consecuencia de la actividad fisiológica celular (en una neurona, por ejemplo), tisular (en el tejido muscular, por ejemplo) y orgánica (en el corazón, por ejemplo). Con el desarrollo de los SQUID, se ha podido medir la intensidad del campo magnético asociado con la actividad bioeléctrica de las neuronas. El registro de los CM, relacionados con la actividad bioeléctrica de la corteza cerebral humana, condujo al desarrollo de la técnica de la *magnetoencefalografía*, de muy reciente aplicación en el diagnóstico

clínico. La intensidad del CM producido por la actividad de las neuronas es del orden de femtoTeslas (fT) ( $1\text{fT} = 10^{-15} \text{ T} = 10^{-11} \text{ Gauss}$ ) (10 órdenes de magnitud por debajo del valor de intensidad del CMT). De hecho, el CM, producido por las neuronas, está muy por debajo de cualquiera de los CM ambientales a los que con más frecuencia estamos expuestos. Probablemente, las propiedades eléctricas y magnéticas de las neuronas les proporcionen su extraordinaria sensibilidad a dichos campos y expliquen los sutiles mecanismos de respuesta, como hemos demostrado con nuestros experimentos.

Por otra parte, hemos de considerar que, cada modelo experimental biológico permite un conjunto de operaciones y excluye otras. Es decir, capacita para un conjunto de experimentos concretos. Si el objetivo final de una investigación es el estudio de los efectos en la salud, los estudios con animal completo pueden representar una situación más próxima a la realidad que los realizados en células extraídas del mismo, mantenidas *in vitro*. Los experimentos en mamífero pueden considerarse más próximos al hombre que los realizados en organismos más sencillos como son los invertebrados. No obstante, cuando se trata de definir los procesos moleculares subyacentes, cuando se trata de establecer modelos físicos de interacción del CM con el sistema biológico, la complejidad del animal completo puede enmascarar los mecanismos moleculares y resultar inviable el objetivo propuesto. En el caso concreto de estos objetivos, la elección adecuada consideramos que son los experimentos *in vitro* e *in vivo*, sea en células de mamífero en cultivo o utilizando modelos experimentales “sencillos”, es decir, invertebrados, como es nuestro caso. Es preciso, además, tener en cuenta que los mecanismos moleculares básicos, fundamentales para la supervivencia de las especies, son altamente *conservativos* ya que se establecieron muy pronto en la evolución y se han mantenido aun en grupos muy alejados filogenéticamente como pueden considerarse moluscos y mamíferos. Los datos relativos a los elevados tantos por ciento de coincidencia del genoma entre animales como la mosca del vinagre, los primates y el hombre los tenemos que entender desde este enfoque. Por otra parte, los estudios en voluntarios humanos, aunque pudieran proporcionar información valiosa para la evaluación de riesgos para la salud, deben realizarse en condiciones de seguridad para el sujeto y la manipulación queda muy limitada. El número de individuos que se pueden estudiar siempre es restringido en el conjunto de la población y, debido a que la población humana no es genéticamente homogénea, las respuestas individuales a unas condiciones de exposición determinadas, pueden dar una gran variabilidad de resultados. De la experiencia obtenida con nuestro trabajo experimental, y de los datos consultados sobre los efectos biológicos de los CM descritos, hemos llegado a la

conclusión de que los efectos biológicos inducidos, son *sutiles*. Esto implica que los efectos inducidos pueden pasar desapercibidos para el observador y, puede resultar difícil distinguir, en tales condiciones, las muestras control de las muestras tratadas. La consecuencia es que se puede llegar tanto a ignorar los efectos inducidos como a definir falsos positivos si el modelo escogido no es el adecuado. No se debe admitir, no obstante, que *sutil* se haga sinónimo de *poco importante*.

Las dos tendencias enfrentadas, mantenidas respectivamente por los investigadores independientes, de una parte, y por las compañías que generan y emiten CEM, de otra, se pueden resumir en dos frases:

*...las compañías deben demostrar que la exposición a CEM en el rango de las radiaciones no ionizantes es inocua para la población.*

*...es imprescindible que la investigación básica demuestre que la exposición a CEM en el rango de las radiaciones no ionizantes es nociva para la salud.*

Deberíamos considerar, por lo tanto, qué es *investigar en salud*. En el caso concreto de la investigación clínica la situación es evidente. Pero, cuando se trata de investigación básica, no queda clara la proyección que los datos experimentales pueden tener en lo que definimos como el *estado de salud* de un individuo, y, no digamos, de una población. La aplicación del reduccionismo en el método científico nos lleva, en nuestro quehacer cotidiano, al estudio de procesos extraordinariamente concretos, una molécula, una neurona, una variación de frecuencia, una variación de amplitud.... La aplicación del principio de inducción científica, los resultados experimentales procedentes de muchas fuentes diferentes, incluso obtenidos en muestras biológicas que nada tienen que ver aparentemente entre sí, como ya hemos señalado, serán el soporte para la extrapolación de los datos obtenidos en especies sencillas, alejadas aparentemente, del modelo humano. Todo este proceso es difícil y se necesita largo tiempo para llegar a conclusiones concretas que siempre vendrán de la comunidad de los científicos.

La evidencia de estos aspectos se ha visto reflejada en las recomendaciones que la OMS ha dado en relación con el enfoque de los estudios sobre los “*Efectos Biológicos de los Campos Electromagnéticos*”: estudios simultáneos *in vitro*, *in vivo*, en voluntarios humanos, preclínicos y clínicos, además de epidemiológicos junto con el desarrollo de *modelos físicos* que puedan dar una explicación de las interacciones de los CEM con los sistemas biológicos. En el año 1997 la OMS se comprometió con el Proyecto “*CEM y Salud*” y con publicar las conclusiones a las que se hubiera llegado, en el año 2005. En Octubre de 2004 se remitió a los expertos en este campo, para su corrección y propuesta de sugerencias, el documento titulado: “*Static Fields Health Environmental Criteria*”. Querriamos destacar ahora la medida en que los resultados y modelos físicos arriba propuestos han sido aceptados por la OMS en el citado documento.

En el apartado dedicado a los *mecanismos de interacción* se destaca nuestro trabajo de revisión, publicado en el año 1994, como el primero de una serie:

“...*Several excellent reviews of the possible physical interactions of static magnetic fields have been published including Azanza and del Moral (1994); Goodman et al. (1995); Grissom (1995a); Frankel & Liburdy (1996); Valberg (1997); Beers et al. (1998); Adair (2000); Zhadin (2001); Binhi (2002); Binhi & Savin (2003)..*”.

En relación con los mecanismos de interacción se considera bien establecido, sobre las bases de los datos experimentales, el efecto de los CM estáticos basado en el diamagnetismo anisotrópico y el mecanismo propuesto en el modelo de liberación de calcio:

“...*This mechanism is the basis for some detailed models of effects in lipid bilayers (Helfrich, 1973; Tenforde and Liburdy, 1988; Gaffney and McConnel, 1974), subsequent effects on calcium liberation (Azanza and del Moral, 1994; del Moral and Azanza, 1992), and an explanation of how mitotic structures may be affected by large fields (Denegre et al., 1998; Valles, 2002), resulting in abnormal embryonic development...*”.

En dicho documento se aporta una amplia relación de datos experimentales sobre los efectos inducidos por campos magnéticos estáticos. Los estudios *in vitro* se destacan como de

gran utilidad en la investigación de los mecanismos de interacción y para indicar el tipo de efectos que pudieran ser investigados *in vivo*. No obstante, no se consideran como prueba suficiente para identificar efectos en la salud sin previa corroboración en experimentos *in vivo*. Como hemos indicado anteriormente, la extrapolación de datos exige de datos experimentales obtenidos desde fuentes diferentes.

Con respecto a los *efectos en la fisiología de la membrana* se destacan las neuronas de los ganglios de molusco como un modelo experimental *idóneo*, por el tamaño relativamente grande de las neuronas, que simplifica su manipulación:

*“...Most studies on the effects of SMF on membranes concern exposures of short duration and with low flux densities. Rodent nerve preparations and hippocampal slices are frequently used, but also snail ganglia and single snail neurons serve as models, because the relatively large size of molluscan neurons makes them easy to manipulate...”*

En dicho documento se expresan conclusiones como la que sigue:

*“...The general impression from all these studies is that in isolated systems and cultured cells, exposure to SMF in the millitesla range is able to change membrane properties, possibly through changes in (calcium) ion channel structure and/or activity. These changes may lead to changes in neuronal functioning, such as changes in action potential generation and, consequently, neurotransmitter release...”*

Se destacan los resultados positivos y negativos con respecto a las modificaciones de la morfología y funciones celulares con campos en el rango de mT. Se señala la importancia de la evaluación previa de variables biológicas como el tipo de célula, el estado de activación celular, la concentración de los ligandos destinados a enlazarse, además de otras condiciones fisiológicas. En el caso de algunos efectos inducidos se ha podido incluir el umbral de estimulación pero, otros estudios, indican respuestas de naturaleza no-lineal, sin valores claros de umbral e incluso mostrando ventanas de “densidades de flujo magnético”. No se ha estudiado la “dosimetría”, por lo que no está claro si los equivalentes a “dosis”, “tiempo de exposición”, “intensidad” son aplicables para la cuantificación de los efectos observados y su

utilización para establecer valores estándar de seguridad para la población. Tampoco se tiene un conocimiento consistente sobre el tiempo de exposición que pudiera afectar a los sistemas biológicos *in vitro*. Se concluye, por lo tanto, que parece posible que exista una dependencia complicada de las variables biológicas con respecto de los parámetros físicos tales como intensidad, duración y recurrencia de la exposición para explicar los efectos de los CM estáticos.

En relación con las fuentes generadoras de CM estáticos conviene destacar los datos relativos a los producidos por los imanes permanentes de los altavoces (auriculares) y micrófonos de dispositivos comúnmente utilizados para escuchar música y televisión o incluso en los propios teléfonos convencionales. Algunos de los auriculares, de pequeño tamaño, se introducen durante periodos prolongados de tiempo (horas) en el conducto auditivo. Se cita en el anterior documento que producen densidades de flujo magnético de 0,3 a 1,0 mT en su superficie. No obstante, nuestras medidas, realizadas con una sonda Hall de sensibilidad  $100 \pm 10 \mu\text{T}$  y con un magnetómetro flux-gate de sensibilidad  $10^{-4} \pm 0.005 \mu\text{T}$ , dan valores de intensidades muy por encima de aquellos. Hemos realizado medidas directas en los imanes extraídos de los altavoces y micrófonos de 75 teléfonos móviles y de 35 pares de auriculares utilizados habitualmente con equipos de radio y reproductores de música portátiles. Las medidas desde 25 teléfonos fijos y 25 teléfonos inalámbricos se han realizado desde fuera de la carcasa de protección, en posición de escucha. Los valores de densidad de flujo magnético (inducción magnética, B) mas altos son para los altavoces y micrófonos de los teléfonos móviles. Los valores para los altavoces son: máximos de 170-120 mT, intermedios de 68-29 mT y mínimos de 8-6-2 mT. Para los micrófonos los valores máximos son de 17 mT, los medios de 4 mT y los más bajos de 0,015-0,16 mT. La densidad de flujo disminuye considerablemente en los teléfonos fijos (valores comprendidos entre 9,5-7,5-1,05 mT) e inalámbricos (0,8-0,5-0,01) debido a la mayor distancia entre los imanes y la superficie del teléfono y a que los dos imanes del altavoz y micrófono están alejados, mientras que en los teléfonos móviles están muy próximos. En el caso de los pares de auriculares la densidad de flujo presenta valores muy próximos para el par que se utiliza al mismo tiempo, 28-12-6 mT. Estos datos que mostramos son parte del *Informe* remitido a la Comisión responsable del estudio “*CEM y Salud*” de la OMS (Azanza et al., 2004). Incluye la Fig.39 en la que se representa, sobre un corte de encéfalo humano a escala, el alcance de las líneas de distribución de volumen de los imanes permanentes de un teléfono móvil (sobre el oído izquierdo) y de un pequeño auricular (introducido en el pabellón auditivo derecho). Se puede observar que, en

ambos casos, el oído medio está sometido a una exposición de 100  $\mu\text{T}$  y que, el oído interno recibe campos del orden de 10  $\mu\text{T}$ . Obsérvese que, según la Tabla 3 las restricciones para exposición a campo magnético estático están en 40 mT. No obstante, es muy elevado el número de personas que habitualmente utiliza los pequeños auriculares, en particular los jóvenes y, es creciente el número de usuarios que se queja de dolores de cabeza. Entre los profesionales de la radio se citan con frecuencia alteraciones en el equilibrio. No cabe seguir achacando estas manifestaciones al sonido, hay que investigar el efecto del CM estático. La posibilidad de efectos inducidos en el sistema auditivo, de hecho, ha promovido el Proyecto Europeo GUARD que se está llevando a cabo en la actualidad “*Potential adverse effects of GSM cellular phones on hearing*”.

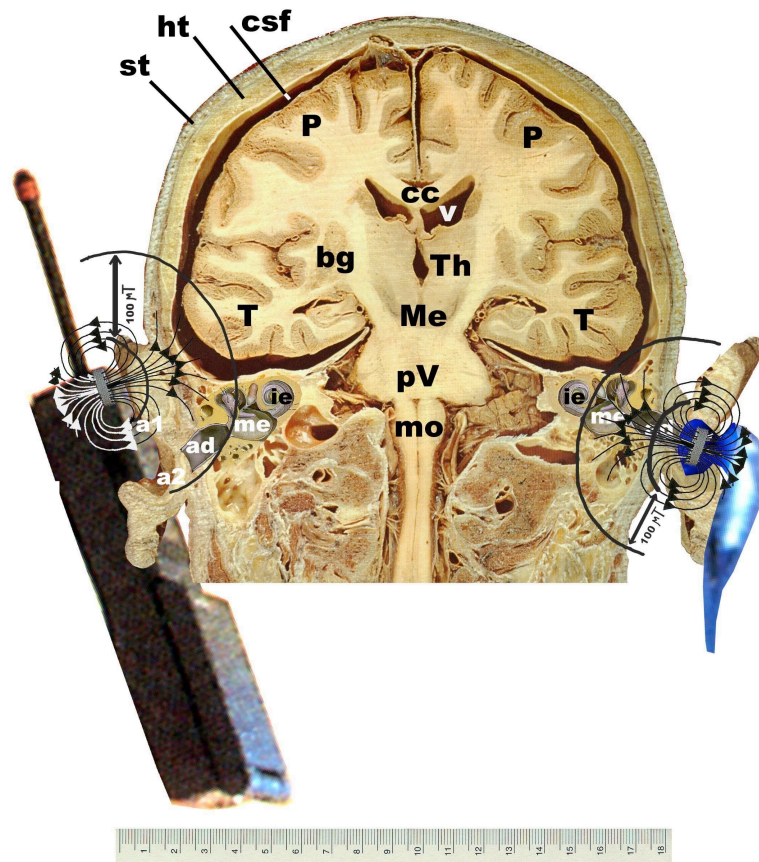


Fig.39.- Sección coronal de la cabeza de un adulto mostrando las estructuras anatómicas del encéfalo, localizadas en el plano de los oídos. Sobre el oído izquierdo, se simula la colocación de un teléfono móvil, y sobre el oído derecho, se ha introducido un auricular en el conducto auditivo externo (ad). Se han representado las líneas de distribución de volumen **B** para los dos imanes. La disminución de la intensidad de **B** con la distancia a los imanes se representa como un sector delimitado por las dos líneas curvas, a<sub>1</sub>-a<sub>2</sub>. La flecha expresa la distancia a la que el valor de la intensidad del CM estático cae a 100 μT. Las estructuras anatómicas representadas son: cc: cuerpo calloso; Me: mesencéfalo; pV: puente de Varolio; mo: médula espinal; P: lóbulos parietales; T: lóbulos temporales; Th: tálamo; V: ventrículos laterales; bg: ganglios basales; ad: conducto auditivo; me: oído medio; ie: oído interno; st: estructuras blandas; ht: tejido duro, hueso; csf: líquido cefalorraquídeo. Los valores de las medidas de las estructuras representadas, se han recogido de las tablas anatómicas de Behrman (2000) (Azanza et al., 2004).



## REFERENCIAS

- Adey W.R. Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields. *Physiol Rev.* 61: 435-513, 1981.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. In: *Molecular Biology of the Cell*. Garland: New York. 1989.
- Azanza, M. J. del Moral, A. Effects of static magnetic fields on isolated neurons. *J.de Phys. Paris*, 12: C8-2059-2060, 1988.
- Azanza M.J. Steady magnetic fields mimic the effect of caffeine on neurons. *Brain Res.* 489: 195-198, 1989.
- Azanza, M.J. Characterization of neuronal membrane  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  channels operated under steady magnetic fields exposure. *J.Mag.Mag.Mat.* 83, 527-529, 1990.
- Azanza, M.J. The molecular basis of neuronal magnetosensitivity. *Trends Comp.Biochem.Physiol.*1, 1083-1098, 1993.
- Azanza, M.J., Blott, B.H., del Moral, A. Peg, M.T. Measurement of the red blood cell membrane magnetic susceptibility. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 30: 43-53, 1993.
- Azanza, M.J., del Moral, A. Cell membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Prog. Neurobiol.*44: 517-601, 1994.
- Azanza, M. J., del Moral, A. Neuron firing frequency dependence on the static magnetic field intensity. *J. Magn.Magn.Mat* 140-144: 1464-1465, 1995a.
- Azanza, M. J., del Moral, A. Isolated neuron amplitude spike decrease under static magnetic fields. *J. Magn.Magn.Mat* 157/158: 593-594, 1995 b.
- Azanza, M. J., del Moral, A.: Isolated neuron amplitude spike decrease under static magnetic fields, *J. Magn. Magn. Mat.* 157-158: 93-594, 1996.
- Azanza, M. J., del Moral, A. ELF-magnetic field induced effects on the bioelectric activity of single neurone cells. *J. Magn.Magn.Mat* 177-181: 1451-1452, 1998.
- Azanza, M.J., Calvo, A.C., del Moral A. 50 Hz Sinusoidal Magnetic fields induced effects on the bioelectric activity of single unit neurone cells. *J Magn Magn Mat*; 226-230: 2101-2103, 2001.

- Azanza, M.J., Calvo, A.C., del Moral, A. Evidence of synchronization of neurones activity of molluscan brain ganglia induced by alternating 50 Hz applied magnetic field. *Electromagn Biol Med.*: 21: 209-220, 2002 a.
- Azanza, M. J., Pérez Bruzón, R.N., Lederer, D., Calvo, A.C., Vander Vorst, A., del Moral A. Reversibility of the effects induced on the spontaneous bioelectric activity of neurons under exposure to 8.3 and 217.0 Hz low intensity magnetic fields. Proceedings of the “2nd International Workshop: Biological Effects of EMFs”, Rhodas ; 1: 298-308, 2002 b.
- Azanza, M.J., del Moral, A., Calvo, A.C., Pérez Bruzón, R. N., Pérez Castejón C. Vera Gil, A. Measurements of the static magnetic fields produced by loudspeakers and microphones permanent magnets. Informe remitido a la Comisión de estudio: “*Static Fields Health Environmental Criteria*” OMS, Ginebra, 2004.
- Azanza, M.J., Bruzón, R.N., Calvo, A.C., del Moral, A. Elemental neuron network dynamics under applied sinusoidal magnetic fields. *BioEMS*, Dublín, 2005 a.
- Azanza, M.J., Raso, M., Pes, N., Bruzón, R.N., Junquera, C., Maestú, C, Aisa, J., Lahoz, M., Pérez Castejón, C., Martínez-Ciriano, C., Vera-Gil, A., del Moral, A. Characterization of connexins in neuron submitted to applied EMF. *BioEMS*, Dublín, 2005 b.
- Bardasano, J.L. Der recessus suprapinealis des Hamsters *Cricetus cricetus* unter der Wirkung von kunstlichen Magnetfeldern. I. Ultrastrukturelle Beobachtungen. *Z. mikrosk. -anat. Frosch. Leipzig*, 100: 961-972, 1986.
- Barnes, F.S. The effect of time varying magnetic fields on biological materials. *I.E.E.E. Trans. Magn.* 26: 2092-2097, 1990.
- Bawin, S.M., Kaczmarek, L.K., Adey, W.R. Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 247: 74-81, 1975.
- Bawin, S.M., Adey, W.R. Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental oscillating low frequency electric fields. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 1999-2003, 1976.
- Berridge, J., Galione, A. Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J.* 2: 3074-3082, 1988.
- Blakemore, R.P. Magnetotactic bacteria. *Science* 190: 377-379, 1975.
- Blackman, C.F., Shawnee, G., Benane, L.S., Kinney, W.T. Dennis, E. House. Effects of ELF fields on calcium-ion efflux from brain tissue *in vitro*. *Radiation Res.* 92: 510-520, 1982.
- Blackman, C.F., The biological influences of low-frequency sinusoidal electromagnetic signals alone and superimposed on RF carrier waves. In: *Interactions between Electromagnetic Fields and Cells*,

NATO Series pp.521-536. Eds. A. Chiabrera, C. Nicolini and H.P. Schwan. Plenum Press, New York 1985.

Calvo A. C., Azanza M.J. Synaptic neurone activity under applied 50 Hz alternating magnetic fields. *Comp. Biochem. Physiol.* 124 C: 99-107, 1999 a.

Calvo, A.C., Azanza, M.J.: Electrophysiologic responses of snail neurons under applied 50 Hz alternating magnetic fields, *Electro-Magnetobiology* 18: 305-312, 1999 b.

Calvo A.C. Sincronización de la actividad bioeléctrica neuronal bajo aplicación de campos magnéticos sinusoidales de frecuencia extremadamente baja. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, 2003.

Calvo A.C., Junquera C., Martínez-Ciriano, C., Azanza, M.J. Características ultraestructurales de los ganglios subesofágicos de *Helix aspersa* (mollusca), Congreso Sociedad Española de Histología, Valencia, 2003

Chaikin, P.M. Lubensky, T.C., *Principles of Condensed Matter Physics*, Cambridge U.P., Cambridge, 1995.

Chiabrera, A., Bianco, B. The role of magnetic field in the EM interaction with ligand binding. *Mechanistic Approaches to Interaction of Electromagnetic Fields with Living Systems*. Eds. M. Blank, E.Findl. Plenum Press, New York, 1987.

del Moral, A., Azanza, M.J. Model for the effect of static magnetic field on neurons. *J. Magn.Magn.Mat.* 114: 240-242, 1992.

del Moral, A., Azanza, M. J., Calvo, A. C., Pérez Bruzón, R.N. Cooperative diamagnetism and  $\text{Ca}^{2+}$  liberation of plasma membrane molecules explains the neuron responses to applied static and extremely low frequency magnetic fields. Proceedings of the "2nd International Workshop: Biological Effects of EMFs", Rhodas, 651-659, 2002.

del Moral, A., Azanza, M. J., Pérez Bruzón, R.N. A model explaining frequency resonance effects induced by ELF magnetic fields on neurons (en fase de publicación), 2006

Erwin, D.N., Hurt, W.D. Assessment of possible hazards associated with applications of millimeter-wave systems. *USAF School of Aerospace Medicine Review*, 2-81, 1981.

Galvanovskis, J., Sandblom, J.S., Bergquist, B., Galt, S., Hamnerius, Y. Cytoplasmic calcium oscillations in human leukaemia T-cells are reduced by 50 Hz magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 20: 269-280, 1999.

Gérin, A., Stockbroeckx, B., Vander Vorst, A. Champs micro-ondes et santé. *Hyperfréquences UCL*, pp.:25, 1999.

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

Grodsky, I.T. Neuronal membrane: A physical synthesis. *Math. Biosci.* 28: 191-219, 1976.

ICNIRP Guidelines on limits of exposure to static magnetic fields. *Health Physics*, 66:200-106, 1994.

ICNIRP Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (0 Hz-300 GHz). E.D. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection 2001 (<http://www.icnirp.de>).

Jefferys, J.G.R., Traub, R.D., Whittington, M. A.: Neuronal networks for induced "40 Hz" rhythms, *Trends Neurosci.* 19: 202-208, 1996.

Kackzmarek, L.K. Cation binding models for the interaction of membranes with EM fields. *Neurosci. Res. Program. Bull.* 15: 54-60, 1977.

Kerkut, G.A., Lambert, J.D.C., Gayton R., Loker J.E., Walker, R.J. Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa* neurons, *Comp. Biochem Physiol.* 50A: 1-25, 1975.

Lawrence, A.F., Adey R.A. Nonlinear wave mechanisms in interactions between excitable tissue and electromagnetic fields. *Neurol. Res.* 4, 115-153, 1982.

Liboff, A.R., MacLeod, B.R., Kinetics of channelized membrane ions in magnetic fields. *Bioelectromagnetics* 9, 39-51, 1988.

Linde, T., Mild, K.H. Measurement of low frequency magnetic fields from digital cellular telephones. *Bioelectromagnetics*, 18: 184-186, 1997.

Maestú, C., Pérez Bruzón, R.N., del Moral, A., Azanza, M. J., Neuron dynamics induced by alternating magnetic fields of nT in the range of 7.5-8.5 Hz (en fase de publicación) 2006

NRPB, Advice on limiting exposure to electromagnetic fields (0-300 GHz). Docs NRPB, 15 (2). Chilton, NRPB, 2004.

OMS Static Fields Health Environmental Criteria (2004)

Pérez Bruzón, R.N., Azanza, M.J., Calvo, A.C., del Moral, A. Neurone bioelectric activity under magnetic fields of variable frequency in the range of 0.1-80 Hz. *J.Magn.Magn.Mat.* 272-276, 2424-2425, 2004.

Pérez Bruzón, R.N. Dinámica neuronal bajo la acción de campos magnéticos alternos de bajas frecuencia e intensidad. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, 2005

Pérez Castejón, C., Junquera, C., Pueyo, A., Pérez Bruzón, R.N., Azanza, M.J., Raso, M., Pes, N., Maestú, C., Aisa, J., Lahoz, M., Martínez-Ciriano, C., Vera-Gil, A., del Moral, A. Characterization of neuron membrana ionic protein channels involved in the responses to applied ELF-magnetic fields observed in *Helix aspersa* brain ganglia neurons. *Histol.Histopathol.*, Supp.1, 134, 2005.

Raso, M., Caracterización de proteínas en neuronas expuestas a campo electromagnético: modificación de la expresión de conexina 26. Tesina de Licenciatura, Universidad de Zaragoza, 2005.

Real Decreto del Ministerio de Ciencia y Tecnología de 28 de Septiembre de 2001 (BOE 234. 29 de Septiembre de 2001)

Recomendación del Consejo de 12 de Julio de 1999 relativa a la exposición del público en general a campos electromagnéticos (0 a 300 GHz). 1999/519/CE.DOCE 30.7.1999.L199/59.

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

Semm, P. Neurobiological investigation on the magnetic sensitivity of the pineal gland in rodents and pigeons. *Comp.Biochem.Physiol.* 76 A: 683-689, 1983.

Schwan, H.P. Biophysics of the interaction of electromagnetic energy with cells and membranes. En: *CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, pp. 213-231. Eds. Ch. Polk y E. Postow. CRC: Florida, 1986.

Singer, W., and Gray, Ch.M.: Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis, *Annu. Rev. Neurosci.* 18: 555-586, 1995.

TELECOM, GSM: le téléphone, mais sans le fil!. *TELEmatics* 5: 33-35, 1998.

Tenforde, T.S. Interaction of ELF magnetic fields with living matter. En: *CRC Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, pp. 197-225. Eds. Ch. Polk y E. Postow. CRC: Florida, 1986.

Tenforde, T.S., Biological interactions of extremely low frequency electric and magnetic field. *Bioelectrochem. Bioenergetics* 25: 1-17, 1991.

Ubeda, A., Trillo, M.A. radiaciones RF de antenas de telefonía y salud pública: el estado de la cuestión. *Radioprotección* 20, 24-36, 1999.

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

