

POTENCIAL DE MEMBRANA DE CELULAS NERVIOSAS Y ^{222}Rn EN BALNEARIOS

SOTO TORRES, J* y NORIEGA BORGE, M. J.**

RESUMEN

Mediante técnicas electrofisiológicas se estudia el efecto que tiene el radón sobre el potencial de membrana de la célula F76 de Helix aspersa. Como consecuencia de la acción del radón se observa una variación, despolarización o hiperpolarización, del valor del potencial de membrana. Se discuten los resultados obtenidos a la luz de los efectos que se obtienen en balnearios radiactivos.

PALABRAS CLAVE

Radón - Potencial de membrana - Células nerviosas - Balnearios.

RESUME

On étudie les résultats de l'irradiation avec radon dans le potentiel de repos de la membrane cellulaire de F76 Helix aspersa. Depuis de l'irradiation surgit une variation du potentiel de membrane, dépolarisation ou hyperpolarisation, suivi par une nouvelle valeur d'asymptote. Ces faits expérimentaux peuvent exploquer certaines observations dans l'hydrothérapie.

MOTS CLÉS

Radon - Potentiel de membrane - Cellules nerveuses - Balnéothérapie.

SUMMARY

Changes in the membrane potential of F76 cell of helix aspersa were investigated after irradiation with radon. Immediately after irradiation a despolarisation or hyperpolarisation in observed that is followed by a tendency to a new

membrane potential value. Implications of the results on the observed effects in radioactive spas in discuss.

KEY WORDS

Radon - Membrane potential - Nervous cells - Balneotherapy.

INTRODUCCION

Entre las radiaciones ionizantes que afectan al hombre ocupan un lugar principal las producidas por el radón (^{222}Rn) y por sus descendientes. Estos isótopos radiactivos de origen natural producen en el hombre una dosis equivalente que puede evaluarse en 1mSv/año, en promedio, que se libera en el sistema respiratorio por la desintegración de los descendientes del radón retenidos en él por la respiración, (BEIR V, 1990; ICRP, 1994).

La dosis promedio anual anterior puede tener variaciones importantes en el caso del tratamiento de pacientes en balnearios radiactivos donde, aún recibiendo dosis bajas, puede tomar valores superiores en cada tratamiento. En estas condiciones, el radón penetra en el cuerpo por distintas vías, generando dosis en los diferentes tejidos en proporción a su solubilidad en ellos, (PRATZEL, 1993; GOMEZ, 1994). Por su mayor solubilidad en los lípidos, las dosis mayores se liberan en el tejido nervioso, describiéndose efectos específicos que parecen derivados de la acción de las aguas sobre este sistema.

En este trabajo exponemos la metodología y los primeros resultados de una serie de experiencias realizadas para conocer el efecto que

* Catedrático de Física Médica. Universidad de Cantabria.

** Profesora Titular de Fisiología. Universidad de Cantabria.

tiene el radón sobre el potencial de membrana de células nerviosas in vitro, tomando como modelo experimental el sistema nervioso del caracol común.

MATERIAL Y METODOS

Para el estudio del efecto que producen las radiaciones ionizantes en el potencial de membrana celular hemos elegido el caracol común, *Helix aspersa*, como modelo experimental. Los caracoles se recogen en el campo y se conservan en terrario hasta el momento de ser utilizados. La preparación de las muestras a medir se realiza por extirpación del sistema nervioso del caracol que se coloca en un baño en solución salina. La solución salina usada tiene una composición de 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 3,5 mM de $MgCl_2$, 6 mM de $CaCl_2$ y 10 mM de HEPES, ajustada a pH 7,5 mediante NaOH, 1 M. Utilizando una lupa marca WIND se pueden visualizar las células individuales y, específicamente, la denominada F76, situada en el ganglio parietal derecho, que es distinguible fácilmente por su gran tamaño, unas 150 μm de diámetro (NORIEGA, 1992).

La medida del potencial de membrana de la célula F76 se realiza insertando un microelectrodo de vidrio lleno de solución de KCl, 3 M, en la que se introduce un hilo de plata y colocando otro electrodo metálico de referencia en la solución salina externa. la diferencia de potencial medida entre los dos electrodos es amplificada y filtrada con un sistema AXO-CLAMP 2A y visualizada en un osciloscopio TEKTONX a la vez que muestreada en función del tiempo mediante un ordenador con programa SPIKE 2 que graba en memoria los valores medidos. El esquema del sistema experimental utilizado se representa en la figura 1.

Para exponer las células a distintas dosis de radiación por el radón hemos construido un dispositivo experimental cuyo esquema está representado en la figura 2. Consiste en una ampolla conteniendo ^{226}Ra en solución acuosa unida mediante un sistema cerrado con un extremo

donde se conecta un tubo conteniendo solución salina. El radón emanado desde el radio difunde a través del sistema hasta la solución salina disolviéndose en ésta. La concentración de radón que se alcanza en la solución es función del tiempo que ésta está expuesta en el sistema, (SOTO, 1994).

La concentración de radón obtenida en la solución se mide mediante espectrometría gamma. Para ello se mantiene cerrado el tubo con la solución durante, al menos, 3 horas para que el radón alcance el equilibrio radioactivo con sus descendientes de vida media corta. A continuación se mide usando una cadena de espectrometría gamma con detector de Ge in, protegido por un casillero de hierro, conectado a un analizador multicanal. La concentración de radón disuelto se calcula a partir del conteo bajo los fotopicos de 352 Kev del $Pb\ 214$ y de 611 Kev del $Bi\ 214$, ambos descendientes de vida corta del radón y en equilibrio con él. El sistema de medida ha sido calibrado con muestras de actividad conocida de ^{226}Ra en equilibrio con el radón y sus descendientes, preparadas con la misma geometría que las muestras a medir, (SOTO, 1995).

Una vez obtenida la solución conteniendo radón se sustituye por ésta la que baña la preparación celular. El recambio del medio se realiza una vez que la célula F76 ha alcanzado su potencial de reposo después de insertado el microelectrodo, haciendo gotear la solución con radón en un extremo de la cubeta y recogiendo el líquido en el otro extremo. El proceso de recambio del medio se hace en 1 mm. aproximadamente. Durante todo él, el potencial de membrana registrado se graba en la memoria del ordenador, prolongándose la grabación durante las 4 horas siguientes. No hemos prolongado el registro por tiempos mayores por el deterioro que sufre la célula preparada que daría lugar a variaciones del potencial de membrana no relacionadas con el fenómeno estudiado. Al finalizar cada experiencia se mide el posible error a la salida del electrodo de registro.

RESULTADOS

La metodología experimental utilizada nos ha permitido obtener concentraciones de radón en equilibrio con sus descendientes de vida corta en la solución salina entre $1.5 \cdot 10^5$ y $3.2 \cdot 10^6$ Bq/l. Durante el recambio de medio el radón disuelto pasa desde la solución salina hasta el aire, al encontrar una presión parcial mucho menor en el aire, de manera que la irradiación a las células será debida únicamente a los descendientes radiactivos de vida corta del radón, sólidos que permanecen disueltos en la solución. De entre los descendientes de vida corta del radón los que contribuyen en mayor grado a la dosis absorbida son los emisores de radiación alfa, Po 218 y Po 214, debido a la mayor energía de las partículas alfa y a su pequeño recorrido en el agua que hace que se deposite toda la energía en la solución.

La dosis absorbida en la solución, y también en las células, en cada experiencia puede calcularse, después de las consideraciones anteriores, por la energía depositada por la desintegración completa de los descendientes de vida corta del radón emisores alfa. Esto es así porque el tiempo de exposición a la radiación es muy superior al periodo de los descendientes del radón, que puede considerarse que decaen totalmente. Conocida la concentración inicial de todos ellos, ya que se encuentran en equilibrio radiactivo con el radón, puede calcularse fácilmente la dosis absorbida total que producen. A partir de las concentraciones iniciales de radón obtenidas en la solución salina puede calcularse que las dosis absorbidas resultantes están comprendidas entre $8.2 \cdot 10^{-4}$ y $1.6 \cdot 10^{-3}$ Gy.

De la misma manera que se calculan las dosis totales pueden calcularse las tasas de dosis. Estas se corresponden con la velocidad de desintegración de una muestra formada por descendientes del radón, inicialmente en equilibrio radiactivo. La dosis por unidad de tiempo no es constante sino que disminuye desde el instante inicial, liberándose la mayor parte de la energía en la primera hora después del recambio del medio.

Con la metodología descrita hemos hecho una serie de experiencias de estudio del efecto de la radiación sobre el potencial de membrana de la célula F76. De entre las experiencias realizadas hemos eliminado aquellas en las que la célula estudiada no poseía un potencial de reposo normal, entre -40 y -60 mV, y también aquellas otras en las que el electrodo de medida presentaba un error a la salida superior a 5 mV.

Excluyendo los casos anteriores hemos hecho 12 registros de la evolución del potencial de membrana. En ellos se observan dos tipos de respuestas. La primera forma de evolución del potencial de membrana consiste en una despolarización lenta de pequeña magnitud, 6 a 16 mV, a partir del valor del potencial de reposo inicial. Este tipo de respuesta se encuentra en la tercera parte de las células estudiadas. La segunda forma de evolución del potencial de membrana consiste en una hiperpolarización, rápida al principio y más lenta después, de una magnitud comprendida entre 6 y 40 mV, tendiendo hacia un nuevo valor del potencial. Este tipo de respuesta se encuentra en dos terceras partes de las células estudiadas. Las hiperpolarizaciones producidas tienen magnitudes muy diferentes. En la mayor parte de los casos son de poca intensidad, entre 6 y 16 mV, aunque aparecen otras de magnitud mucho mayor, hasta 40 mV, que se corresponden con células que tenían inicialmente un potencial de reposo elevado, inicialmente despolarizadas.

Los registros obtenidos en caso de hiperpolarización presentan una evolución del potencial de membrana semejante. A partir del potencial de reposo inicial, una vez estabilizado después del insertado el electrodo, el recambio de medio produce ondas de despolarización por estimulación mecánica que producen el disparo de la célula cuando superan una amplitud. Después de cada una de ellas el potencial de membrana recupera su valor inicial. Una vez recambiado el medio se produce una hiperpolarización continua de la célula que es más rápida al principio y más lenta después pareciendo tender hacia un nuevo valor del potencial.

No hemos encontrado relación entre los dos tipos de respuesta y la dosis empleada, ni tampoco correlación entre la dosis liberada y la magnitud del cambio del potencial

DISCUSION

Es bien conocido que el potencial de membrana de las células nerviosas es una consecuencia del gradiente electroquímico de los iones K^+ , Cl^- y Na^+ que se establece a través de ella. Las diferencias de concentración de estos iones y la diferencia de potencial entre los dos lados de la membrana establecen flujos dependientes de la resistencia que son compensados por los creados por la bomba $Na-K$; lo que, en condiciones estacionarias, determinan el potencial de membrana. El valor del potencial puede alterarse, además de cambiando las concentraciones intra y extracelulares de alguno de los iones o aplicando campos eléctricos, por variaciones de la resistencia de la membrana, (ECKERT, 1990).

A pesar de que no existen experiencias de estudio del efecto del radón sobre el potencial de membrana, se ha estudiado cómo es afectado por otros tipos de radiaciones, como los rayos X o la radiación gamma. En estas experiencias se encuentra que dosis elevadas de radiación producen una despolarización de la membrana. La despolarización se justifica por un aumento de la resistencia de la membrana consecuencia del deterioro inducido por la radiación, (ANNAEVA, 1985; GUNTHER, 1974). Experiencias con dosis bajas dan resultados menos concluyentes descritos como oscilaciones del valor del potencial de membrana (REDMAN, 1977). A la vez se observa la existencia de flujos de K^+ dependientes de la dosis de radiación, (KUO, 1993).

Los resultados encontrados por nosotros añaden nuevos datos a los anteriores. En algunas ocasiones, igual que anteriormente, parece producirse un deterioro de la membrana, con aumento de su resistencia, que genera una despolarización de aquella. La disminución de la resistencia de la membrana puede justificarse por la acción de los oxidantes producidos por la

radiación en el agua sobre grupos sulfurados de la membrana, (VILLS, 1979). Sin embargo, en la mayor parte de las experiencias se produce una hiperpolarización, en algunos casos de magnitud importante, que no podría justificarse de la misma manera.

Tanto en el caso de despolarización de la membrana como en el de hiperpolarización, el efecto producido parecer ser indirecto, por acción de la radiación sobre el medio, debido a la pequeña probabilidad de que una célula en la preparación sea alcanzada por una partícula alfa. El efecto del radón sobre la membrana se muestra así como primario con respecto a otros efectos típicos de la acción de las radiaciones sobre las células, como la rotura de moléculas de ADN, que serían una consecuencia de la entrada de iones y de la modificación de las concentraciones de éstos en sus interiores, (MORGAN, 1986).

Es interesante señalar que el estudio de los efectos sobre células nerviosas recupera alguna de las propiedades que se suponen debidas a la radiación en los balnearios radiactivos. En éstos se señala la existencia de un efecto regulador del tono en los pacientes, que se atribuye a una respuesta hormonal, (ARMIJO, 1994). Sin negar la posibilidad de efectos hormonales, las experiencias descritas parecen señalar que el efecto puede darse por la acción a nivel celular. El valor del potencial de membrana determina en gran medida la magnitud de los efectos a los cuales dan respuesta las células nerviosas, fijando un determinado valor para el estímulo umbral. Una hiperpolarización de la membrana es equivalente a un aumento en el valor del estímulo umbral, a una respuesta sólo a estímulos mayores, y a una acción relajante y antiespasmódica a nivel global.

La explicación anterior puede completarse a partir de las experiencias realizadas. Según los datos encontrados se producirá una acción relajante solamente en determinados casos, mientras en otros se producirá la acción contraria. Sin embargo, las acciones relajantes intensas, que se corresponderían con hiperpolarizaciones importantes, aparecerán en individuos inicialmente

débiles, como aparecen en las células en las que el potencial de membrana inicial es demasiado elevado.

La pequeña probabilidad de que la célula pueda ser alcanzada por una partícula alfa obliga a considerar que la acción del radón sobre la membrana no es una consecuencia de la dosis de radiación en las células sino a la producción de oxidantes en el agua por la radiación. Los grupos oxidantes producidos por el radón actuarían sobre la membrana dando lugar a reacciones que modificarían el valor del potencial del reposo. Admitiendo esta explicación, los efectos encon-

trados derivados de la acción del radón dejarían de ser específicos, pudiendo producirse por la acción de otros agentes oxidantes, (KONINGS, 1979). Consecuentemente, el mismo tipo de efectos podría ser característico de balnearios con aguas no radiactivas aunque con sustancias disueltas capaces de producir oxidación.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Prof. Juan C. Mateos de la Universidad de Sevilla su colaboración en la preparación bibliográfica del trabajo.

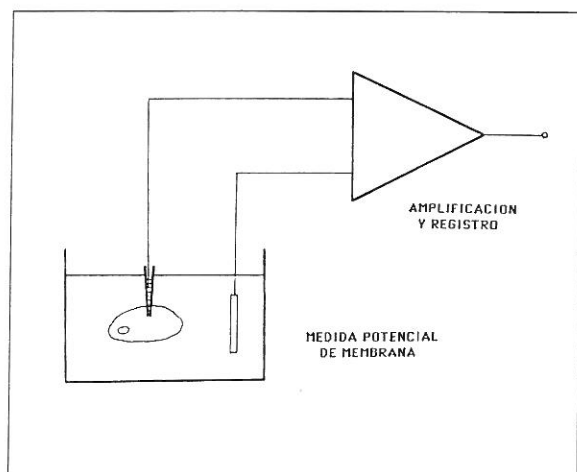


Fig. 1: Esquema del dispositivo experimental utilizado para la medida del potencial de membrana celular.

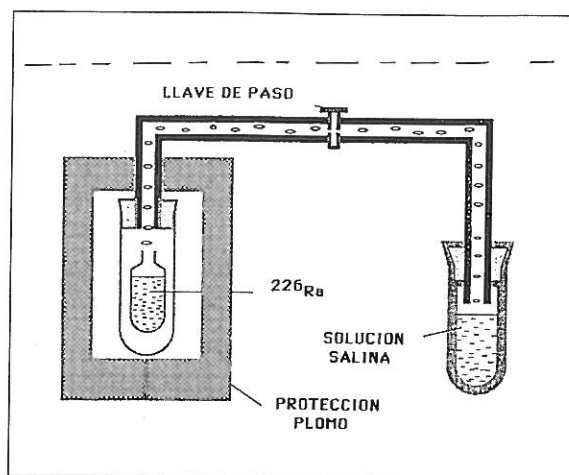


Fig. 2: Esquema del dispositivo experimental utilizado para disolver ^{222}Rn en la solución salina de las preparaciones celulares.

BIBLIOGRAFIA

- ANNAEVA, L. P.; PARKHOMENKO, I. M.; SIDIROV, A. S. (1985): "The influence of ionizing radiation on membrane potential and electric input resistance of chinese hamster fibroblasts". Radiobiologia, 25, 723-727.
- ARMIJO, M.; SAN MARTIN, J. (1994): "Curas balnearias y climáticas. Talasoterapia y Helioterapia". Madrid Ed. Complutense.
- BIOLOGICAL EFFECT OF IONIZING RADIATION V. (1990): "Health effects of exposure to low levels of ionizing radiation". Washinton. Ed. Academic Press.
- ECKERT, R.; RANDALL, D.; AUGUSTINE, G. (1990): "Fisiología animal". Madrid. Ed. Interamericana-McGraw Hill.
- GOMEZ-ARZAMENA, J. (1994): "Medida de niveles de radiactividad en aguas. Estimación de las dosis de radiación producidas". Tesis doctoral. U. Cantabria.
- GUNTHER, J.; HUG, O. (1974): "Acute effects of X-irradiation on membrane potential and membrane resistance of snail neuros". Radial. Environ. Biophys. 11, 171-177.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (1994): "Protection against Rn 222 at home and at work". ICRP 65. New York. Ed. Pergamon Press.
- KONINGS, A. W. T.; DRIJVER, E. B. (1979): "Radiation effects on membrane". Rad Res, 80, 494-501.

KUO, S. S.; SAAD, A. H.; KOONG, A. C.; HAHN, G. M.; GIACCIA, A. J. (1993): "Potassium-channel activation in response to low doses of gamma irradiation involves reactive oxygen intermediates in nonexcitatory cells". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 908-912.

MORGAN, J. I.; CURRANT, T. (1986): "Role of ion flux in the control of c-fos expression". *Nature*, 322, 552-555.

NORIEGA, M. J. (1992): "Neuronas centrales relacionadas con la respuesta a la estimulación del manto y el control de la actividad del pneumostoma en *helix aspersa*". Tesis doctoral. U. Oviedo.

PRATZEL, H. G. (1993): "Acción de las aguas mineromedicinales. Efectos generales de las aplicaciones tópicas". *Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med.* 3, 33-38.

REDMANN, K.; REICHEL, G. (1977): "The effect of roentgen rays on the transmembrane potential and on the electrophoretic

mobility of polymorphonuclear leukocytes and Fl-cells". *Radiat. Environ. Biophys.* 12, 21-30.

SOTO, J.; QUINDOS, L. S.; COS, S.; SANCHEZ-BARCELO, E. J. (1994): "Estudio in vitro de los efectos del Rn 222 en dosis balneoterápicas sobre células tumorales humanas". *Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med.* 3, 133-137.

SOTO, J.; FERNANDEZ, P. L.; GOMEZ, J.; RODENAS, C. (1995): "Study of the occurrence of Rn 222 in drinking water in Spain". *Health Phys.* 69, 6, 961-965.

SOTO, J.; FERNANDEZ, P. L.; QUINDOS, L. S.; GOMEZ, J. (1995): "Radioactivity in spanish spas". *Sci. Total Environ.* 162, 187-192.

WILLS, E. D.; WILKINSON, A. E. (1970): "Effects of irradiation on subcellular components". *Int. J. Radiat. Biol.* 17, 229-236.



MANANTIAL CAPUCHINA

Afecciones de hígado y vías biliares

MANANTIAL SAN VICENTE

Afecciones renales y de vías urinarias

MANANTIAL EL SALADO

*Afecciones de aparato locomotor
y aparato respiratorio*

SERVICIO DE BALNEOTERAPIA:
Baños, baños de burbujas y carbogaseosos
Duchas y masajes subacuáticos

INSTALACIONES:
Nebulizaciones y erosoles

MECANOTERAPIA Y ELECTROTERAPIA:
Masajes vibratorios, tracciones, onda corta

INSTALACIONES DEPORTIVAS:
Tenis, Frontón, Badminton
Parques infantiles

Temporada oficial:
1º de JUNIO al 31 de OCTUBRE

SIERRA NEVADA (Granada). A 50 kms. de Granada, 135 de Almería y 146 de Málaga.

INFORMES: Aguas de Lanjarón, S.A.

Teléf.: 77 01 37/62 • Télex: 78408 ALGRA • Lanjarón (Granada)