

UCH-FG
MAG-Biof.med
R173
C.I



Est. de Grado 28/6/11



**¿Existe un mecanismo de magnetorecepción
fotodependiente en el tectum óptico de las aves?**

Tesis

Entregada a La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Biofísica Médica

Facultad De Ciencias

Por

Edgardo Enrique Ramírez Fuentes

Mayo 2011

Director de Tesis Dr: Juan Carlos Letelier

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

Edgardo Enrique Ramírez Fuentes

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Biofísica Médica, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día **18 de Enero del 2011**.

Director de Tesis:

Dr. Juan Carlos Letelier

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Julio Alcayaga

Dr. Jaime Roessler

Dr. German Kremer

Letelier
Julio Alcayaga
Jaime Roessler
German Kremer





Agradecimientos

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia y dando ánimo.

Es por esto que quiero agradecer a mi familia y amigos por apoyarme en todo momentos durante el desarrollo de esta tesis. En particular quiero agradecer a mi profesor guía el Dr. Juan Carlos Letelier, quien me oriento y consejo durante el tiempo que duró esta tesis.



Índice general

autobiografía	II
Agradecimientos	III
Índice general	IV
Índice de figuras	VII
Índice de cuadros	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCION	5

2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. Generación del Campo Magnético	23
2.1.1. Campo Magnético generado artificialmente	25
2.2. Medición del Campo Magnético	31
2.2.1. Sensor Magnético	32
2.2.2. Sistema de adquisición de datos y control	33
2.2.2.1. Generación y adquisición de datos	33
2.2.2.2. La tarjeta de adquisición de datos	36
2.2.2.3. Generación de la corriente eléctrica	36
2.2.3. Calibración del sensor magnético	39
2.2.3.1. Linealidad de las bobinas de helmholtz	42
2.3. Ejecución De Registros Intracelulares In-Vivo motivados por el fenómeno de la magnetorecepción en aves	45
2.3.1. Primera Parte del Procedimiento Experimental	45
2.3.1.1. Preparación de las paloma para la realización de los ex- perimentos.	45
2.3.2. Montaje del sistema de magneto-foto estimulación	51
2.3.2.1. Montaje del sistema de estimulación magnética	51
2.3.2.2. Montaje del sistema de foto estimulación	52
2.4. Análisis de datos.	53
2.4.1. Cuantificación de las respuestas.	53
2.4.2. Diferentes maneras de cuantificar respuestas neuronales.	57
2.4.2.1. Distribución de Amplitud de LFP.	57
2.4.2.2. Las repeticiones	61
2.4.2.3. La envolvente	62

3. RESULTADOS	64
3.1. Uretano	67
3.1.1. Tectum Óptico Derecho	67
3.1.2. Tectum Óptico Izquierdo	69
3.2. Ketamina-Xilacina	70
3.2.1. Estimulación uniplanar lenta	71
3.2.2. Estimulación multiplanar lenta	71
3.2.3. Estimulación multiplanar horizontal lenta	72
3.3. Palomas despiertas	72
3.3.1. Palomas comunes	73
3.3.2. Palomas mensajeras	73
3.4. Resumen de experimentos efectuados	74
4. DISCUSIÓN	77
Bibliografía	112

Índice de figuras

1.1. Distribución espacial de minerales de hierro en el pico de la paloma	9
1.2. Diagrama de canales magnéticos	10
1.3. Diagrama par-radical	14
1.4. Diagrama de energía par-radical del Criptocromo	15
1.5. Vías Visuales de las palomas	17
1.6. Diagrama retino-tectal	19
2.1. Vector Magnético	24
2.2. Campo magnético a través de una espira	26
2.3. Bobinas de Helmholtz	27
2.4. Distribución del Campo Magnético como función de la separación de las bobinas de Helmholtz	29
2.5. Sensor Magnetico	32

2.6. Diagrama circuito de reseteo sensor magnético	33
2.7. Pulsos generado por el circuito de reseteo	34
2.8. Diagrama del Sistema de Adquisición y Generación de datos	36
2.9. Circuito Amplificador de Potencia	38
2.10. Calibración sensor magnético eje X	40
2.11. Calibración sensor magnético eje Y	41
2.12. Calibración sensor magnético eje Z	41
2.13. Calibración bobina eje X	43
2.14. Calibración bobina eje Y	43
2.15. Calibración bobina eje Z	44
2.16. Diagrama de paloma en estereotaxico	47
2.17. Manipulador de electrodos	49
2.18. Eléctrodo de 16 canales	50
2.19. Eje óptico de la paloma	52
2.20. Estimulo Visual	54
2.21. Datos LFP de 7.5s de duración	55
2.22. Datos LFP con posible estimulo	56
2.23. Histograma LFP	58
2.24. Intervalo de 99 % de confianza	59
2.25. Repeticiones de un registro	62
2.26. Envolverte e Histograma	63
3.1. Estímulos Magnéticos Artificiales	66
3.2. Respuestas del TO con estimulación magnética y anestesia (uretano)	70
3.3. Respuestas del TO con estimulación magnética y anestesia (Ket-Xil)	72
3.4. Variabilidad de lo Resultados	76

4.1. Citas a la fecha	79
4.2. Registros positivos de actividad magnética en el cerebro de las palomas	90
4.3. Marcador positivos de actividad magnética en el cerebro de las palomas	92
4.4. Registros negativo de actividad magnética en el cerebro de las palomas	94
4.5. Resumen de la actividad magnética en el cerebro de las palomas	99



Índice de cuadros

2.1. Respuestas sobre 99 % del intervalo de confianza (2/rep)	60
2.2. Respuestas sobre 99 % del intervalo de confianza (1/rep)	60
2.3. Respuestas sobre 99 % del intervalo de confianza (3/rep)	61
3.1. Tabla Resumen	75



RESUMEN

Las aves tienen una bien desarrollada sensibilidad magnética pero la electrofisiología básica de esta sensibilidad es aun debatida. En los últimos años se ha presentado una interesante hipótesis que relaciona la magnetorecepción con la fotorecepción. Sin embargo, la sensibilidad magnética en aves, como las principales vías sensoriales que están involucradas en su detección, son aun un problema abierto. Desde finales de los 1970, han sido reportadas unidades magneto-sensibles en el ganglio trigémino, el núcleo de la raíz óptica basal (nBor) y el tectum óptico (TO) de las palomas. Curiosamente, incluso mas de 70 % de las unidades tectales han sido reportadas como sensibles al campo magnético (Semm y Demaine [1986]). Este importante resultado nunca ha sido replicado hasta la fecha. Como el TO en las aves es un núcleo que recibe input visuales, auditivos y posiblemente magnéticos, es importante confirmar el importante rol que jugaría la sensibilidad magnética sobre las células tectales ya que el sistema tectofugal de las aves es central para la habilidad de las palomas de realizar coordinación sensor-motor.

Esta tesis es un esfuerzo sistemático para encontrar unidades magnetosensible en el sistema tectofugal de las aves, con el objetivo de confirmar o desdecir la única publicación de 1986. Se usaron tanto palomas comunes como mensajeras, bajo condiciones despierta y anestesiada, con dos distintos protocolos de anestesia. Registramos en el TO (capas 1-10) y también en el núcleo Istmo parvo celular (Ipc) usando electrodos simples y múltiples (16 canales). En cada condición de registro nosotros generamos un campo magnético que se movía en diversos planos como son los planos coronal como sagital.

Para comprobar la calidad del campo magnético producido artificialmente, medimos continuamente el vector campo magnético con un sensor magnético tri-axial. A pesar de nuestros esfuerzos, no encontramos respuestas neuronales (TO y Ipc) que fueran moduladas por la orientación del campo magnético (n=90, unidades registradas). Estos registros fueron realizados bajo condiciones de oscuridad, luz azul, verde y rojo, tanto en vigilia como bajo los protocolos de anestesia ya mencionados. Este resultado difiere enormemente de los resultados previos Semm y Demaine [1986] que reportaban un 70 % de unidades tectales magneto sensibles. Esto sugiere que es necesario reconsiderar si la neuronas magneto sensibles realmente se encuentran en el sistema tectofugal en aves. Considerando lo anterior, se discuten nuestros resultados en el contexto de la existencia de dos modelos de magnetorecepción y de resultados positivos usando marcadores de actividad neuronal.

ABSTRACT

Birds have a well developed magnetic sensitivity, but basic electrophysiology of this sense is still debated. During the last years an interesting hypothesis has been presented which relates magnetoreception with photoreception. However, magnetic sensitivity in birds, as well as the main sensitive pathways which are involved in its detection, are still an open problem. Since the end of the 1970s, magneto-sensitive units have been reported in the trigeminal ganglion, the nucleus of the basal optic root (nBOR) and the optic tectum (OT) in pigeons. Curiously, even more than 70 % tectal units have been reported as sensitive to the magnetic field (Semm y Demaine [1986]). This important result never has been replicated until now. Because the optic tectum in birds is a nucleus that receives visual, auditory and possibly magnetic inputs, it is important to confirm the important putative role that magnetic sensitivity plays on tectal cells, as the tectofugal avian system is central for the sensory-motor coordination ability of pigeons.

This thesis is a systematic effort to find magneto-sensitive units in the tectofugal avian

system, with the aim of confirming or denying the single publication from 1986. We used both common and racing pigeons, under awake and anesthetized conditions with two different anesthesia protocols. We recorded both the OT (layers 1-10) and the nucleus isthmi parvocellularis (Ipc), using single and multi (16- channel) electrodes. In each recording condition we generated a magnetic field that moved in different planes such as the coronal and the sagittal planes.

To test the quality of the artificially produced magnetic field, we continually measured the magnetic field vectors with a tri-axial magnetic sensor. Despite our effort, we did not find neuronal responses (OT and Ipc) that were modulated by the magnetic field orientation (n=90 recording units). These recordings were made under darkness and red, green and blue light conditions, both under vigilance and under the already mentioned anesthesia protocols. These results differed greatly from the previous results Semm y Demaine [1986], which reported 70 % magneto-sensitive tectal units. These findings suggests that the concept that magneto-sensitive neurons are found in the tectofugal avian system should be reconsidered. Taking into account the previous information, we discuss our results in the context of two magnetoreception models and of positive results using neural activity markers.

1

INTRODUCCION

Las aves tienen sin lugar a dudas un sentido perceptual magnético. Evidencia masiva, robusta y antigua lo ha demostrado en experimentos fenomenológicos desde comienzo del siglo XX (Keeton [1971], Wiltschko [1968]). Pero aunque está claro que las aves son magneto-sensibles (es decir, usan el campo magnético para orientarse) no existe aun claridad acerca de los mecanismos físicos y neuronales que permiten dicha sensibilidad magnética llamada magneto-recepción. Es claro que esclarecer los mecanismos neuronales básicos de la magnetocepción, en un vertebrado tan complejo como las aves, tiene muchas implicancias para nuestro entendimiento de como funcionan los sistemas perceptuales en general. El problema de elucidar la magnetocepción en aves tiene varias aristas: desde el mecanismo físico subyacente en el sensor magnético (es decir la naturaleza biológica del sensor magnético), hasta como las neuronas magneto-sensibles son usadas para coordinar el comportamiento del animal como un todo coherente, es decir la neurobiología de la magnetorecepción. Interesantemente, existe un sólo experimentos de registro extra-

celular en el Tectum Óptico de palomas que muestran que neuronas tectales son sensibles a campos magnéticos similares en magnitud y orientación al campo magnético terrestre (Semm y Demaine [1986]). Este trabajo, publicado ya hace un cuarto de siglo, ha sido extensamente citado (77 citas hasta mediados de 2010) pero es curioso que un fenómeno tan notable no haya sido visitado una y mil veces por otros neurocientistas y que solo exista este solitario trabajo el cual se ha constituido como una "prueba", citada por muchos pero comprendida por pocos, en apoyo de la idea de que existen neuronas magneto sensibles en el tectum óptico de las aves.

Dada la relevancia del tema, y sobre todo para entender como se logra la integración sensorial, es que he decidido presentar esta tesis en la que efectúo experimentos de registro neuronal para replicar y expandir el trabajo de Semm y Demaine [1986]. Para entender todas las implicancias, como los problemas de esta investigación, es necesario hacer primero un resumen del campo de la magnetorecepción. Trataré de dar a conocer los principales mecanismos de la magnetorecepción en aves, y también como no son solo las aves, los unicos animales en utilizar el campo magnético terrestre para orientarse y navegar. Por lo tanto la primera parte de esta introducción necesariamente consiste de una presentación mas o menos extensa de la magnetorecepción en aves.

Magnetorecepción en vertebrados

La sospecha de que las aves usan el campo magnético terrestre para su orientación ya surgió en el siglo XIX (Viguer [1882], von Middendorff [1859]), la primera evidencia "dura" recién se obtuvo hacia 1970. Esta evidencia es solo psicofísica y usó el paradigma de la sensibilidad al mapa estelar como modelo de trabajo (Emlen y Emlen [1966]). Como punto importante hay que destacar que no solo las aves son magnetosensibles, se ha de-

mostrado que peces (Heiligenberg [1991], Meyer y col. [2005], Kalmijn [1982]), anfibios (Diego-Rasilla y Phillips [2007], Phillips [1977]), reptiles (Cain y col. [2005b]) y mamíferos son magnetosensibles. Increíblemente se ha mostrado recientemente que los rumiantes (vacas y ciervos) son magnetosensibles (Begall y col. [2008]) y también los murciélagos (Wang y col. [2007]). Como se ha dicho, en aves (sobre todo en aves migratorias como el European Warbler (*Erithacus rubecula*) (“Carricero Común”) la magnetorecepción es- ta probada a nivel de conducta, pero no se ha podido entender los mecanismos físicos y neuronales que la posibilitan.

Aves y los dos mecanismos

En aves se han postulado dos posibles mecanismos magnetoreceptores:

1. Un mecanismo, que podría denominarse el modelo clásico, y que dependería de pequeños cúmulos o “clusters” de cristales de magnetita y maghemita que se encuentran en el pico de las palomas. Estos pequeños cúmulos cristalinos se encuentran específicamente en las dendritas de neuronas sensoriales del pico superior (Tian y col. [2007]). Estos cristales están dispuestos en una serie regular de cilindros de 20-30 μm de largo, mezclados con pequeñas esferas de 5 μm de diámetro (Ver fig.1.1-b). Esta estructura peculiar que almacena los cristales de magnetita y maghemita logra, mediante un mecanismo aun desconocido, influenciar las descargas de fibras axonales (en el pico superior) que viajan por el nervio trigémino.
2. Un mecanismo, llamado mecanismo par-radical o hipótesis química, basado en reacciones químicas que tienen la particularidad de ser dependientes de fotones de onda

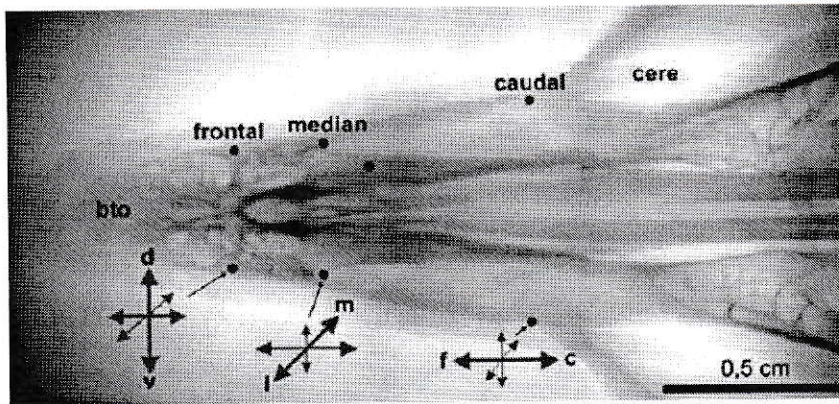
corta (i.e. azul y verde) y además de ser influenciables por campos magnéticos débiles. De acuerdo a este modelo, la magneto-recepción sería un fenómeno *catalizado* por luz. La física de este mecanismo (putativo) es sofisticada y, de ser cierto, abriría la puerta a noveles aplicaciones tecnológicas.

En los últimos años se ha acumulado bastante evidencia experimental (experimentos conductuales sobre aves) que sugiere que las aves migratorias ocupan ambos mecanismos magnetoreceptores simultáneamente, ocupando para su orientación el modelo de la magnetita y para la navegación el modelo par-radical. Para profundizar el conocimiento sobre este dinámico campo es conveniente leer el numero especial de Interface Proceedings Royal Society (Kirschvink y col. [2010]).

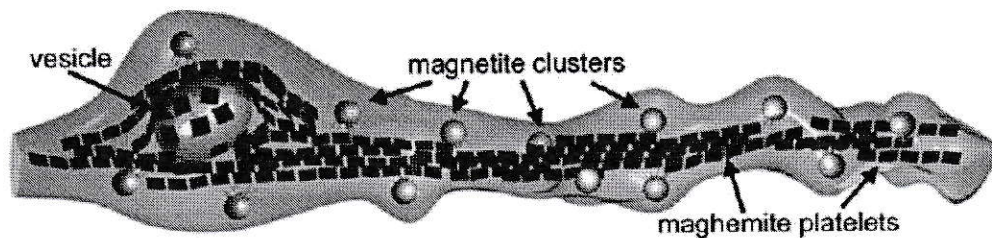
El mecanismo basado en magnetita.

Existen numerosas técnicas que han demostrado la existencia de materiales magnéticos (principalmente magnetita Fe_3O_4 y maghemita $\gamma - Fe_2O_3$), en una gran variedad de animales como bacterias (Blakemore [1975], Mann y col. [1990]), aves, peces, tortugas y abejas (Cain y col. [2005b]). En la paloma en particular se han utilizado rayos-X y microscopia de fuerza atómica (ver Fig.1.1) para probar la existencia de magnetita y magnemita localizados en áreas bastantes específicas del pico superior de la paloma y de otras aves migratorias (Falkenberg y col. [2010]). Estos minerales se encuentran distribuidos en seis áreas bien definidas, encontrándose tres grupos por cada lado del pico de la paloma ubicados en la parte frontal, medial y caudal de ésta. La unidad funcional de este mecanismo es aparentemente un conjunto de dendritas (Fleissner y col. [2007], Wiltchko y col. [2006]) en cuyo interior se encuentran los minerales magnéticos. Curiosa e

indicativamente la orientación de las unidades magnéticas en las 3 regiones del pico es aproximadamente perpendicular entre si, sugiriendo un sistema triaxial (Falkenberg y col. [2010], Fleissner y col. [2007]).



A)



B)

Figura 1.1: Distribución espacial de minerales de hierro en el pico de la paloma

A) Imagen de rayos-x del pico superior de una paloma. Se aprecian tres regiones (frontal, medial y caudal) donde se concentran los minerales de hierro. Cada área presenta una orientación definida para los campos dendríticos, definiendo de esta forma un eje tri-axial donde l lateral, m medial, r rostral y v ventral. B) Dibujo esquemático de una dendrita que contiene los distintos clusters y plaquetas de magnetita y maghemita. (imagen adaptada de Gerta Fleissner y col. 2007)

Este mecanismo permitiría determinar la polaridad del campo magnético, cosa que no se puede determinar con el sistema par-radical. El mecanismo basal sería que los cristales de magnetita actuarían como pequeñas agujas imantadas... y por lo tanto sentirán el torque del campo magnético sobre ellos. Este torque lo deformaría y esta deformación tendría un efecto sobre conductancias (aun desconocidas) en las dendritas de algunas neuronas

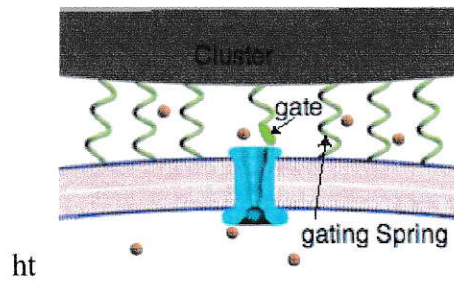


Figura 1.2: Diagrama de canales magnéticos

Este diagrama muestra un posible mecanismo de canales magnéticos ubicados en las dendritas en el pico superior de las palomas, donde se ubican los clusters de magnetita y magnemita en el pico superior de las palomas.

El cluster se conectaría con el canal mediante un "gating spring", el que esta encargado de taponar el canal si el cluster se encuentra cerca del canal y de abrir el canal si el cluster se aleja del canal. La deformación del cluster se produciría al verse expuesto a un campo magnético. Diagrama modificado de Solov'yov y Greiner [2007].

sensoriales ubicadas en el pico (ver Fig. 1.2). Hay que recalcar que si bien existen estas estructuras neuroanatómicas en el pico superior de las aves no se ha probado en forma irrefutable que ellas tengan que ver con la magnetorecepción.

Se han realizados pocos trabajos en que se encuentran respuestas a estímulos magnéticos en el nervio trigémino (Shcherbakov y Winklhofer [1999], Solov'yov y Greiner [2007]) dando a entender de que esta vía podría ser una clara candidata para explicar la magnetorecepción en aves. Posteriormente se realizaron experimentos conductuales en los que se entrena a las palomas con campos magnéticos, para luego cortar el nervio trigémino encontrándose que la paloma sigue respondiendo a estímulos magnéticos (Heyers y col. [2010], Mora y col. [2004]). Esto nos muestra dos resultados que aparentemente se contrapondrían, dejando en claro que no es fácil aceptar o rechazar un modelo por completo.

Como acabamos de ver no hay suficiente evidencia para afirmar con certeza que el modelo de la magnetita es 100% válido, por esto es que se han utilizados métodos alternativos para determinar si en los núcleos cerebrales donde llega parte de la innervación del nervio trigémino, hay sensibilidad magnética (Heyers y col. [2010]). El procedimiento utilizado fue mediante la aplicación de anticuerpos, dicho anticuerpo es una proteína

llamada “ZENK” la que reacciona frente a actividad neuronal.

Se compararon dos zonas cercanas al nervio trigémino: el núcleo sensorial principal del nervio trigémino (PrV) y el núcleo del trigémino espinal (SpV). Bajo la acción de un campo magnético artificial controlado se encontró que había una mayor activación de ZENK en PrV que en SpV. Estos resultados ayudan a afiatar el modelo de la magnetita ya que este modelo permitiría transmitir la información de los receptores magnéticos a través del nervio trigémino.

El mecanismo par-radical.

El mecanismo par-radical (Ritz y col. [2000, 2004, 2009]) es considerado como el modelo principal en la magnetorecepción de aves, ya que explicaría por qué las aves son capaces de orientarse bajo luz de cierta longitud de onda (verde y azul principalmente) y se desorientan cuando la luz es roja. Antes de explicar este mecanismo es útil mencionar que durante 1960-1975 existieron muchos experimentos, en palomas mensajeras, que mostraron que las palomas se desorientaban si el día estaba nublado.

El mecanismo par-radical puede ser representado por dos moléculas: una molécula donadora B y una molécula receptora A. Cuando la molecula B es excitada por un fotón (luz azul) cede un electrón desapareado a la molécula A, transformándose ambas moléculas A y B en radicales y resultando en una reacción par-radical. Esta reacción puede ser representada por un acoplamiento de una partícula con carga negativa y otra de carga positiva, ambas de spin $1/2$, siendo los spines $1/2$ y $-1/2$ representados por flechas \uparrow y \downarrow respectivamente. El spin total del sistema par-radical queda definido por las 4 combinaciones posibles de sus spines (Cohen-Tannoudji y col. [1996], Griffiths [1994]):

(1.1)

$$\uparrow\uparrow, \downarrow\downarrow, \uparrow\downarrow, \downarrow\uparrow$$

En esta tesis no se hará una demostración matemática de como se obtienen los distintos parámetros (números cuánticos) que definen un acoplamiento cuántico entre dos partículas; solo nos concentraremos en un pequeño análisis cualitativo para su entendimiento.

Cada uno de los cuatro posibles condiciones del sistema de spines puede ser caracterizado por un numero cuántico “m”, que corresponde a la suma de los spines.

(1.2)

$$\begin{aligned} \uparrow\uparrow: m &= 1 \\ \uparrow\downarrow: m &= 0 \\ \downarrow\uparrow: m &= 0 \\ \downarrow\downarrow: m &= -1 \end{aligned}$$

Ahora introduciremos un cambio en la notación para la descripción de las 4 posibilidades del spin total del sistema, esta notación se escribe de la siguiente forma: $|s\ m\rangle$ donde “s” denota el momento angular total del sistema. El momento angular “s” en este sistema pueden tomar solo los valores 1 y 0:

(1.3)

$$\begin{aligned} |1\ 1\rangle &= \uparrow\uparrow \\ |1\ 0\rangle &= \frac{1}{\sqrt{2}}(\uparrow\downarrow + \downarrow\uparrow) \\ |1\ -1\rangle &= \downarrow\downarrow \end{aligned}$$

Hacemos notar que tenemos tres posibilidades de acoplamientos entre los spines con un momento angular total $s=1$, las que comunmente se llaman estados de **Triplete**. Las nuevas nomenclaturas se escriben en base a una combinación lineal de la nomenclatura anterior ec.1.1. La cuarta combinación del sistema de spines corresponde a:

(1.4)

$$|00\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}}(\uparrow\downarrow - \downarrow\uparrow)$$

Esta combinación tiene momento angular total $s=0$ y a diferencia del caso anterior solo tenemos un caso con este momento angular. Este estado cuantico comunmente se llama estado de **Singlete**.

Volviendo al sistema original llamado par-radical, éste es capaz de encontrarse en dos estados cuánticos posibles: el estado Singlete y el estado Triplete. Ambos estados tiene asociados niveles de energía distintos, siendo el estado con mayor energía el del Estado Triplete.

A pesar de lo complejo de este mecanismo es posible encontrar reacciones similares en otros procesos biológicos ya detenidamente estudiados, como la fotosíntesis. Este modelo plantea que durante la generación de un par-radical, cuando no hay un campo magnético externo, el spin del sistema se encontraría principalmente en el estado singlete. En dicho estado la molecula que forma el par-radical no estaría en condiciones de producir un estimulo capaz de gatillar un potencial de acción en la neuronas de su entorno¹. Por el contrario, si la molecula que produce la reacción par-radical se encuentra bajo la acción de un campo magnético la probabilidad de encontrarse en un estado triplete aumenta en el tiempo (con una geometría optima entre campo magnético y el spin del sistema). Este estado permitiría la interacción con moléculas de su entorno permitiendo así la generación de un potencial de acción en las neuronas que la circundan (ver Fig.1.3-a).

La interacción de un campo magnético (CM) con una molécula en un estado par-radical puede ser modelada con una interacción de Efecto Zeeman y un Acoplamiento Hiperfino. Si esto se lleva a cabo bajo condiciones optimas (máxima interacción), lo que depende altamente de la geometría entre el CM y el spin (par-radical), puede ocurrir que el spin total del par-radical tenga una mayor probabilidad de encontrarse en un estado triplete (ver Fig.1.3-b). Esto se traduce en un mayor tiempo en el estado triplete, el cual seria

¹Neuronas ganglionares

suficiente como para que la molécula sea capaz de inducir la generación de un potencial de acción.

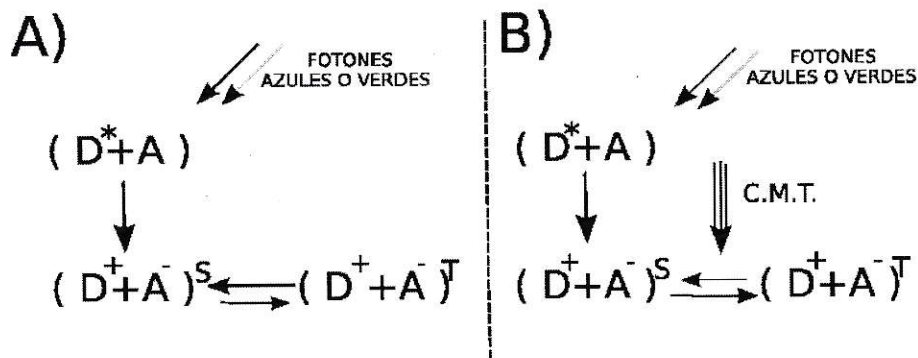


Figura 1.3: Diagrama par-radical

A) En el diagrama se muestra el efecto de fotones sobre la molécula D , que al ser excitada se transforma en el radical D^* , capaz de interactuar con la molécula A para formar un par-radical. Este par-radical puede estar en un estado cuántico triplete (superíndice T) o singlete (superíndice S), con una probabilidad de estado $S > T$, sin la interacción del campo magnético. B) Se observa en el diagrama la formación de una reacción par-radical similar al caso A), pero en presencia de un campo magnético débil (ej. campo magnético terrestre). Mediante una interacción de "Efecto Zeeman" el campo magnético cambia el estado cuántico predominante de la reacción par-radical a un estado $T > S$, siendo éste el fenómeno que posibilita que la molécula par-radical interactúe con su entorno, para así producir un potencial de acción.

Consideremos ahora que existen una serie de moléculas en plantas (por ejemplo Criptocromo y Fotoliasa (Giovani y col. [2003], Zeugner y col. [2005]) capaces de realizar una reacción par-radical, lo cual ha sido establecido teórica y experimentalmente, y que para estas moléculas los efectos del campo magnético terrestre han sido estudiados en un sistema par-radical en soluciones, fotosíntesis bacterial y reacciones enzimáticas. Dentro de estas moléculas, el Criptocromo (Cry) es la principal candidata para formar un par-radical. En plantas la reacción par-radical en los Cry se realiza bajo la acción de luz verde-azul y recientemente se ha demostrado como cambia la molécula bajo la acción de un campo magnético. Es interesante que el Cry puede encontrarse en la retina de muchos vertebrados incluyendo la aves migratorias (Mouritsen y col. [2004]). Estos autores realizaron un estudio en el que detectaron Criptocromos en la retina de aves migratorias, aunque no se

suficiente como para que la molécula sea capaz de inducir la generación de un potencial de acción.

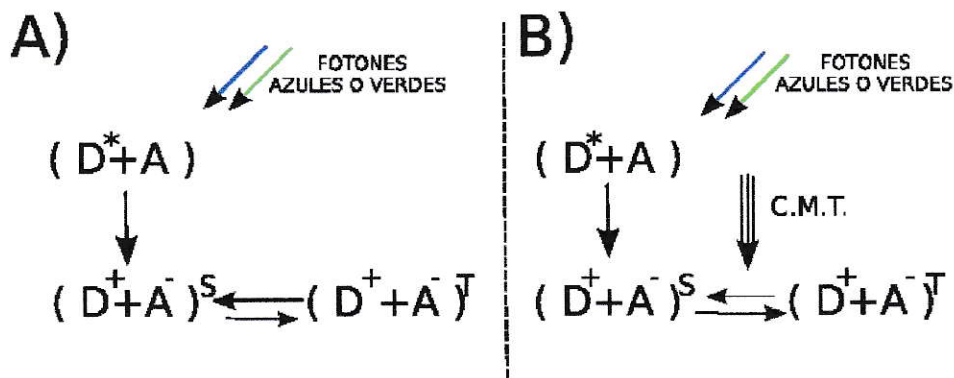


Figura 1.3: Diagrama par-radical

A) En el diagrama se muestra el efecto de fotones sobre la molécula D , que al ser excitada se transforma en el radical D^* , capaz de interactuar con la molécula A para formar un par-radical. Este par-radical puede estar en un estado cuántico triplete (superíndice T) o singlete (superíndice S), con una probabilidad de estado $S > T$, sin la interacción del campo magnético. **B)** Se observa en el diagrama la formación de una reacción par-radical similar al caso **A**), pero en presencia de un campo magnético débil (ej. campo magnético terrestre). Mediante una interacción de “Efecto Zeeman” el campo magnético cambia el estado cuántico predominante de la reacción par-radical a un estado $T > S$, siendo éste el fenómeno que posibilita que la molécula par-radical interactúe con su entorno, para así producir un potencial de acción.

Consideremos ahora que existen una serie de moléculas en plantas (por ejemplo Criptocromo y Fotoliasa (Giovani y col. [2003], Zeugner y col. [2005]) capaces de realizar una reacción par-radical, lo cual ha sido establecido teórica y experimentalmente, y que para estas moléculas los efectos del campo magnético terrestre han sido estudiados en un sistema par-radical en soluciones, fotosíntesis bacterial y reacciones enzimáticas. Dentro de estas moléculas, el Criptocromo (Cry) es la principal candidata para formar un par-radical. En plantas la reacción par-radical en los Cry se realiza bajo la acción de luz verde-azul y recientemente se ha demostrado como cambia la molécula bajo la acción de un campo magnético. Es interesante que el Cry puede encontrarse en la retina de muchos vertebrados incluyendo la aves migratorias (Mouritsen y col. [2004]). Estos autores realizaron un estudio en el que detectaron Criptocromos en la retina de aves migratorias, aunque no se

pudo demostrar directamente que los Criptocromos encontrados fueran capaces de formar una reacción par-radical.

Los Cry de la retina de las aves y vertebrados se encuentran específicamente dentro de las neuronas ganglionares de la retina (Baily y col. [2002], Mouritsen y col. [2004]). Revisando la estructura molecular terciaria del Cry (ver Fig. 1.4-A), notamos la existencia de un cromóforo (FAD) cerca de una cadena de tres triptófanos (Trp-400, Trp-377 y Trp-324). El cromóforo y los triptófanos interactúan entre sí para formar la reacción Par-radical; en Fig.1.4-B se puede apreciar el esquema energético de un modelo que muestra como sería una posible interacción entre el FAD con la cadena de Trp.

A)

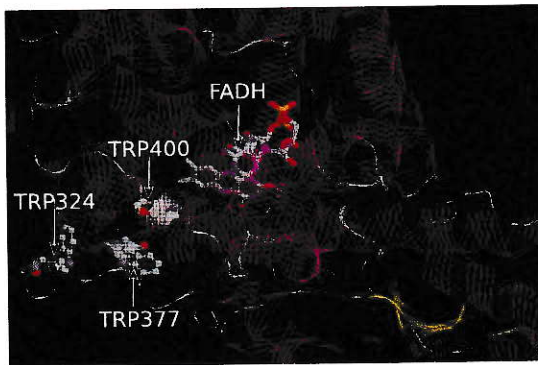
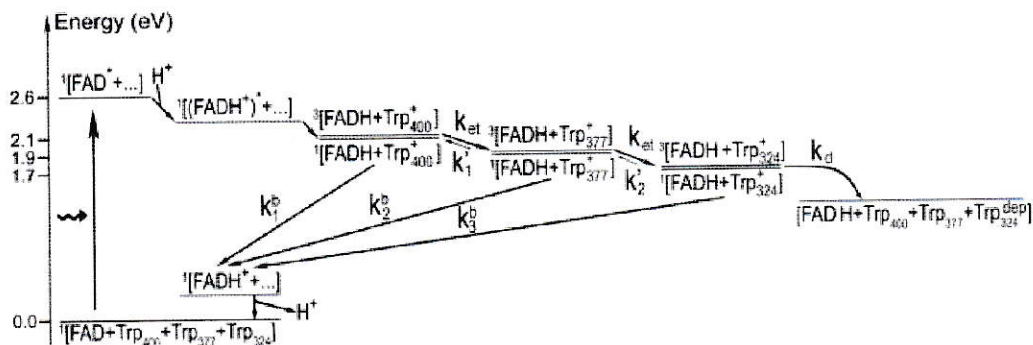


Figura 1.4: Diagrama de energía par-radical del Criptocromo

A) Esquema de una proteína Cry en cuyo interior se observa una molécula FADH y la cadena de tres Trp. B) En esta figura podemos ver un modelo que nos describe el proceso de formación de la reacción par-radical en sus distintas etapas, desde la absorción del fotón por parte de la molécula FAD hasta su oxidación a FADH⁺ siendo esta la molécula que forma el par radical con Trp-400, Trp-377 y Trp-324.

B)



Dicho modelo plantea que al ser excitado por fotones azules el FAD se protona para luego interactuar con un molécula de ácido ascórbico cercana, transformándose en el cofactor FADH, el cual a su vez es capaz de interactuar con el TRP mas cercano de la cadena.

El primer par-radical que se forma es $FADH + Trp-400^+$, (el Trp-400 es el más cercano de la cadena). Luego se forma el par-radical $FADH + Trp-377^+$, reacción en la que el $Trp - 377$ cede un electrón al $Trp - 400^+$ transformándolo en $Trp - 400$. Por último se forma el tercer par-radical $FADH + Trp-324^+$ al ceder el Trp-324 un electrón al $Trp-377^+$.

Sistema Retino Tectal

Recapitulando, las palomas tendrían dos mecanismos para sensar el campo magnético terrestre: el mecanismo par-radical Ritz y col. [2000, 2009], utilizado para la navegación, basándose en la existencia de células magneto receptoras fotosensibles, encontrándose en la retina de las aves, y el mecanismo basado en magnetita Fleissner y col. [2007], Tian y col. [2007], ubicado en el pico de la palomas, lo que le permitiría determinar la polaridad del campo magnético (mecanismo que funcionaría a través del nervio trigémino). Nuestro estudio, aunque no se compromete con ninguno de los dos modelos, es cercano al mecanismo par-radical, ya que las células receptoras de este mecanismo se encuentran en la retina, lo que implicaría que cualquier estímulo magnético en las células magneto receptoras tendría que provocar una respuesta en el tectum óptico (TO) de la paloma, siendo el TO el principal núcleo cerebral que recibe inervaciones neuronales de la retina (nervio óptico). Ya que la parte inicial del mecanismo par-radical en las aves se llevaría a cabo en su retina, la única vía de salida de estas señales es a través del nervio óptico. Cabe recordar que el nervio óptico proyecta a los núcleos cerebrales contralaterales principalmente (ver Fig.1.5).

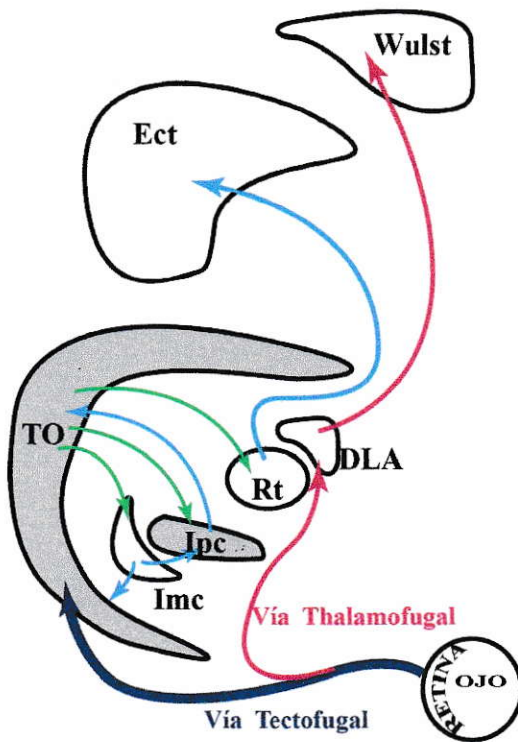


Figura 1.5: Vías Visuales de las palomas

Este Diagrama muestra las principales vías visuales de las aves: En azul la Vía Tectofugal donde el mayor porcentaje del nervio óptico del ojo derecho proyecta sobre el TO contralateral y viceversa. Luego en verde y celeste se ven las principales eferencias y aferencias que tiene el TO con los núcleos Itsmicos (ej: Itsmo magno celular (Imc), Itsmo Parvo celular (Ipc) y el Itsmo Óptico (ION)) y también las conexiones con el núcleo rotundo (Rt) y el Entopallio (E). En rojo la Vía Thalamofugal donde nuevamente las proyecciones de la retina (porcentaje menor que la vía anterior) proyectan principalmente al núcleo lateral dorsal anterior talámico (DLA) y luego al Wulst. También se aprecia la pequeña proyección del nervio óptico al pequeño núcleo llamado núcleo de la raíz óptica basal (nBOR).

Hay que mencionar que en Wulst al igual que en nervio trigémino se encontró actividad magnética mediante un marcador de actividad neuronal ZENK, aunque no se han realizados experimentos electrofisiológicos para complementar dichos resultados.

En gris se observan las áreas donde se realizaron los distintos registros durante el desarrollo de esta tesis.

En las palomas la cantidad de células ganglionares que conforman el nervio óptico es bastante grande ($\approx 2,4 \cdot 10^6$ neuronas), de las cuales el 95 % llega a un núcleo especializado llamado Tectum Óptico (TO). Este es el principal núcleo al que llegan las señales provenientes de la retina, pero no el único, ya que también existen otros núcleos mas pequeños. Ejemplos de tales núcleos son el núcleo dorsolateral anterior del tálamo (DLA)

al que proyectan $\approx 4.97\%$ de las fibras, y el núcleo de la raíz óptica basal (nBOR) al que proyectan ≈ 0.02 de las fibras. Debemos destacar que gran parte de la conectividad del sistema visual de las aves se lleva a cabo en el TO, ya que las eferencias desde el TO son del orden de 10^5 neuronas, un número bastante pequeño si lo comparamos por ejemplo con el sistema visual de los humanos.

También repetimos que el objetivo de esta tesis es lograr la primera repetición de los resultados de Semm y Demaine donde se describe que el 70% de las neuronas tectales son magnetosensibles y no hacer un estudio de la fisiología visual del TO.

Tectum El tectum óptico es una estructura estratificada formada por 13 capas claramente diferenciables, de las cuales las 7 primeras (desde la superficie hacia el interior) reciben inervación de la retina del ojo contralateral. Las neuronas de la capa 13, llamadas TGC (células ganglionares tectales), son las encargadas de integrar la información proveniente del sistema visual. Las TGC poseen un soma que se encuentra en la capa 13 del tectum óptico y de donde sale una gran ramificación dendrítica que se extiende hasta la capa 5, lo que le permite recibir una gran cantidad de inputs neuronales de gran variedad (entre ellos los inputs del nervio óptico). La cantidad de las TGC es bastante pequeña (aproximadamente unas 100000) y sus aferencias proyectan todas a otro núcleo distinto del TO llamado núcleo Rotundo. Una de las principales características del tectum óptico es que forma un mapa topológico del mundo exterior en las distintas capas, y no sólo recibe inervación del sistema visual sino también del sistema auditivo, así como también inervación somatosensorial. Es posible identificar una gran variedad de tipos neuronales encargados de generar el mapa topológico en el TO, y dentro de ésta hay una que destaca particularmente: la neurona llamada paintbrush (representada en color rojo en la Fig.1.6-b). La importancia de las paintbrush es que es la actividad eléctrica de estas neuronas la que se registra al introducir un electrodo extracelular en las capas superficiales TO. Las

paintbrush son las eferencias que proviene de las neuronas del istmo parvocelular y que terminan en el TO, concentrándose principalmente en las capas 5 y 6. Estas neuronas se orientan en sentido vertical y poseen una gran arborización axónica de forma tubular que da origen a su nombre paintbrush (pincel).

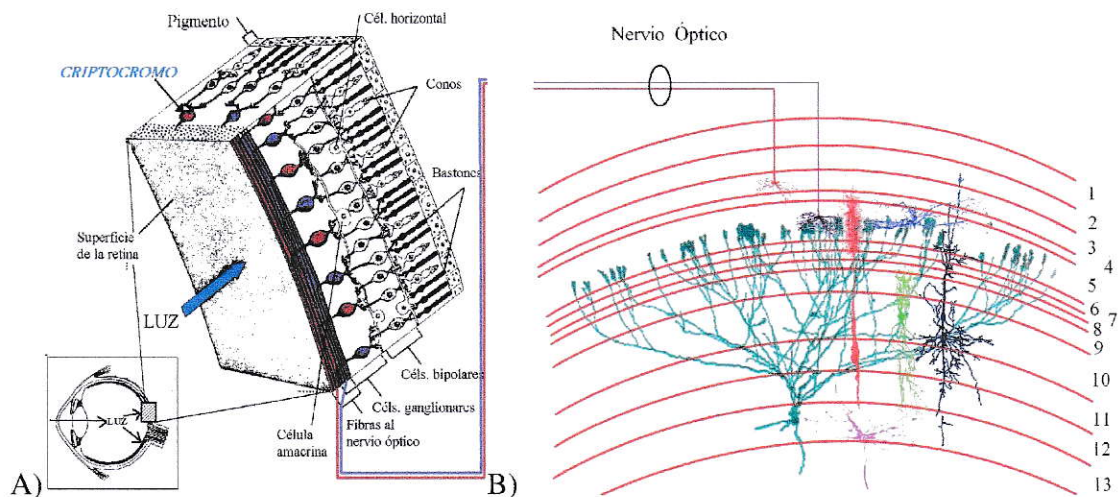


Figura 1.6: Diagrama retino-tectal

A) Se observa un diagrama de una sección de la retina para mostrar como es estimulada por fotones. Los fotones (que posean la longitud de onda adecuada) interactúan primero con los Cry de las células ganglionares de la retina. Aquellos fotones que no interactúan con las células ganglionares siguen su camino hasta los conos, donde interactúan con los pigmentos fotosensibles. Los conos activados a su vez envían una señal que llega de vuelta a las células ganglionares que potencia la señal de los Cry ya activados. Esta señal es finalmente enviada a través del NO hasta TO principalmente. B) En la parte superior se ve como llega el nervio óptico al TO a las 7 primeras capas del TO, estructura de gran variedad de neuronas y gran conectividad neuronal. Entre las neuronas del TO están las TGC (verde oscuro), que participan en la integración de áreas dentro del TO, y las Paintbrush (rojo) que contribuyen a la conectividad focalizada. Es la actividad eléctrica de las neuronas Paintbrush, la que es detectada al hacer un registro extracelular en el TO de las palomas. "Fig-b de Harald Luksch"

A su vez, el istmo parvo celular es un núcleo que recibe aferencias del TO a través de unas neuronas llamas shepherd's crook, las que proyectan en el Istmo parvo celular una organización topográfica idéntica a aquella del TO.

Respuestas neuronales magnéticas en TO Hace mas de 20 años se publicó el primer y único trabajo sobre estimulación magnética a la retina de las aves, registrando las respuestas del tectum óptico y en el núcleo de la raíz óptica basal (nbor) de las aves (palomas) por Semm y Demaine (1986). En el tectum óptico se observó que la respuesta dependía de la variación de la componente vertical del campo magnético aplicado, sin importar la polaridad del campo magnético. Se observó además que debía simultáneamente aplicarse luz de una determinada longitud de onda (entre el verde y el azul) para detectar la respuesta a la aplicación del campo magnético. Estos resultados fueron una de las evidencias para el desarrollo del modelo par-radical. Este trabajo ha sido citado muchas veces como prueba de la existencia de un mecanismo sensorial magnético en TO. A pesar de los resultados de Semm y Demaine no existe referencia de cómo las señales magnéticas provenientes de la retina interactuarían con la multiplicidad de circuitos tectales que están centrados en la visión².

En conclusión, existe una amplia literatura sobre el tema de biomagnetismo en gran variedad de animales. En aves se concentra en dos modelos: la magnetita y el par-radical. Sin embargo, ninguno de estos modelos ha sido comprobado cabalmente. En el caso de la magnetita existe bastante evidencia de la formación de clusters de minerales magnéticos en el pico superior de aves (magnetita y maghemita), habiendo una serie de experimentos conductuales que apoyan este modelo. El problema para validar este modelo comienza con los resultados de los experimentos electrofisiológicos que registran potenciales extracelulares del nervio trigémino. Existen múltiples trabajos (Heyers y col. [2010], Semm y Beason [1990b]) que muestran actividad eléctrica en el nervio trigémino como respuesta a estímulos magnéticos, pero al cortar el nervio trigémino la sensibilidad magnética del ave no se pierde. En consecuencia, no hay certeza acerca del funcionamiento de este mecanismo y de las vías de transmisión de las señales del modelo de la magnetita. Por otro

²Es sorprendente que no existan papers que traten la parte anatómica de la proyección magnética al TO

lado tenemos el modelo par-radical, el cual tiene solo un experimento electrofisiológico a su favor con resultados increíbles y una serie de experimentos conductuales. El problema con estos resultados es que al intentar reproducir los experimentos electrofisiológicos tanto en TO como en otros núcleos cerebrales de las palomas (hipocampo, entopallium), no se ha detectado respuestas asociadas a los estímulos magnéticos con fotoestimulación. Esto nos lleva a cuestionar la validez de los resultados originales que afirman que hay sensibilidad magnética en el TO de las aves, resultados generados por un grupo de detractores del modelo par-radical (Rose [2005]). El esclarecer este mecanismo sensorial en las aves es de gran importancia para entender la integración de los distintos sistemas sensoriales en el TO (sistema visual, auditivo y somatosensorial). Por lo anteriormente expuesto, el objetivo principal de esta tesis es reproducir los resultados de Semm y Demaine de 1986, en que detectan que el 70 % de las células tectales son sensibles a estimulación magnética. El hecho de no encontrar sensibilidad magnética en el TO sería de gran importancia para reorientar la investigación sobre los sistemas de magneto-recepción en las aves.

2

MATERIALES Y MÉTODOS

En la serie de experimentos realizados durante la tesis fue de crucial importancia prestar atención a una serie de factores fundamentales para la realización de experimentos relacionados con biomagnetismo, dichos factores son:

- **Generación del Campo Magnético**
- **Medición del Campo Magnético**
- **Ejecución de registros extracelulares in-vivo**
- **Análisis de Datos**

Los experimentos de biomagnetismo son complejos de realizar por lo que a continuación, siguiendo la lista mencionada anteriormente, revisaremos los métodos y técnicas necesarias para llevar a cabo estos experimentos disminuyendo las probabilidades de errores experimentales.

2.1. Generación del Campo Magnético

Una de las primeras consideraciones para el desarrollo de esta tesis es poder definir un vector magnético \vec{B} arbitrario (por muy simple que esto parezca, resulta mas complejo de lo esperado). Experimentos antiguos sólo modificaban la componente vertical del campo magnético (Semm y Demaine [1986]). Para llevar a cabo nuestros experimentos se construyó una estructura que se monto sobre el aparato estereotáxico y que permite generar arbitrariamente un Campo Magnético con cualquier orientación e intensidad (por ejemplo, similar al Campo Magnético Terrestre). Es importante hacer notar que en nuestros experimentos la paloma siempre sufre la acción de dos campos magnéticos:

- El Campo Magnético Artificial (generado artificialmente por el experimentador).
- El Campo Magnético Terrestre.

El Campo Magnético Terrestre, como cualquier campo magnético o vector, debe ser representado por su módulo, dirección y sentido. El módulo del campo magnético está dado por el módulo de sus componentes vertical y horizontal; su dirección y sentido están representados por los ángulos de inclinación y declinación, ambos en coordenadas polares:

Ángulo de Inclinación Magnética: Se define como el ángulo formado entre el vector magnético y la superficie de la tierra; éste varia entre 90° cuando el vector magnético es perpendicular a la superficie terrestre (en los polos) y 0° cuando el vector magnético es paralelo a la superficie terrestre (en el ecuador).

Ángulo de Declinación Magnética: Se define como el ángulo que existe entre el norte magnético y el norte geográfico (ver fig 2.1).

Modulo del vector Magnético: El modulo que llamaremos r viene dado por la Ec. 2.1, donde r_v es la componente vertical del campo magnético y r_h es la componente horizontal campo magnético.

$$r = \sqrt{(r_h)^2 + (r_v)^2} \quad (2.1)$$

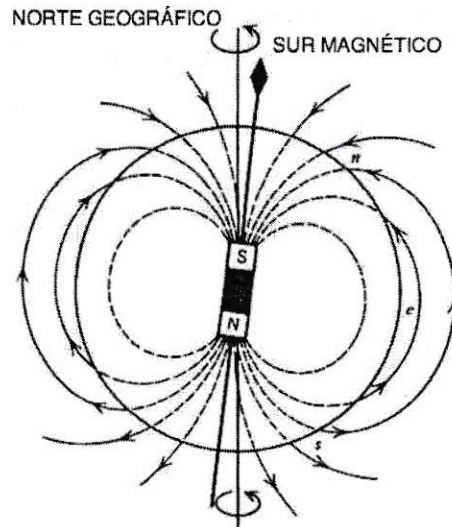


Figura 2.1: Vector Magnético

En este esquema se aprecia una representación de campo magnético terrestre dado por un imán ubicado en el centro de la tierra. Donde el polo norte geográfico coincide con el polo sur magnético. Lo cual es una manera simple pero efectiva de representar el campo magnético terrestre.

La intensidad del Campo Magnético Terrestre no es uniforme, ya que no sólo varía su dirección y sentido debido a la existencia de polos magnéticos, sino que sufre múltiples variaciones producidas por gran variedad factores naturales como son:

- yacimientos minerales
- volcanes
- radiación solar

Es por eso que encontramos que las intensidades de Campo Magnético Terrestre pueden variar desde 0.2 a 0.5 [gauss], dependiendo del lugar geográfico en que se lleve a cabo la medición. En Santiago el Campo Magnético Terrestre (<http://www.ngdc.noaa.gov/geomagmodels/struts/calcIGRFWMM>) tiene las siguientes características:

Intensidad horizontal = 0.20190 Gauss
Intensidad vertical = -0.13446 Gauss
Declinación = 2° 52' (+ este - oeste)
Inclinación = -33° 40' (+ arriba - abajo)

2.1.1. Campo Magnético generado artificialmente

Para la generación del Campo Magnético Artificial nosotros usamos un sistema antiguo y ya probado, utilizando las llamadas *bobinas de Helmholtz*. La teoría detrás de las bobinas de Helmholtz es relativamente simple, y para detallarla recordaremos como se relaciona el campo magnético con la intensidad de corriente que circula a través de una espira circular.

A continuación se presenta la formula matemática que describe la intensidad del campo magnético a lo largo del eje de la espira (ver fig.2.2-B), donde B es la intensidad del campo magnético, R el radio de la espira y H la distancia a la cual se desea medir el campo magnético a los largo del eje:

$$B = \frac{\mu_0 I R^2}{2(R^2 + H^2)^{3/2}} \quad (2.2)$$

Si ahora reemplazamos la espira por una bobina, la intensidad del campo magnético se ve ponderada por el número de vueltas de la bobina, permitiendo expresar la ecuación del campo magnético de la bobina como ec. 2.3. Esta ecuación puede ser extrapolada mediante la ecuación 2.2, donde H es el punto sobre el eje de simetría de la bobina donde se quiere medir el campo magnético (siendo el eje de simetría perpendicular al plano de la bobina, y conteniendo el centro de la misma), R es el radio de la bobina, I es la intensidad de la corriente y N es el número de vueltas de la bobina. El campo magnético generado por una sola bobina no es suficiente para generar un Campo Magnético Artificial que nos permita

emular el Campo Magnético Terrestre, ya que el área sobre el cual este campo magnético es uniforme es casi puntual.

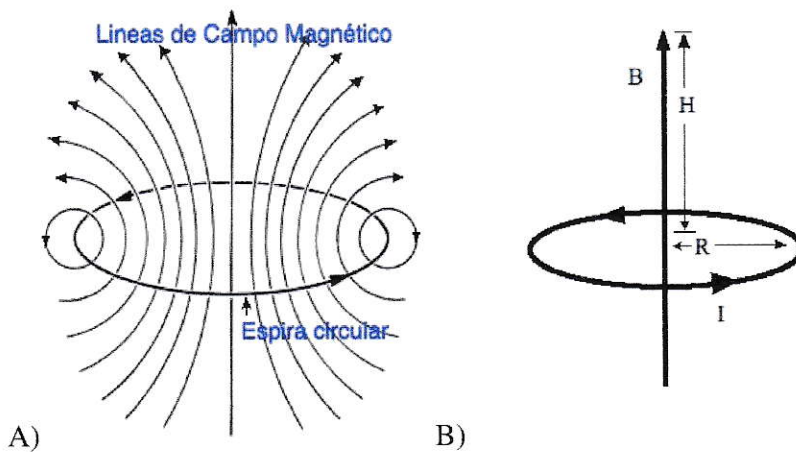


Figura 2.2: Campo magnético a través de una espira

Consideremos una espira en la cual circula una corriente tal como se muestra en la figura A. Esta corriente induce líneas de campo magnético saliendo del plano de la espira, de forma que el campo que se genera en el eje central de la espira es perpendicular al plano de ésta. A medida que nos acercamos a la espira las líneas de campo magnético tienden a curvarse cada vez más hasta formar círculos (cerca de la espira). Como para nuestros experimentos interesa sólo la generación de campos magnéticos uniformes, nos concentraremos en el comportamiento del campo magnético sobre el eje que atraviesa la espira en forma perpendicular al plano de la misma, fig. B.

Curiosamente, el problema de lograr generar un campo magnético *uniforme* sobre una región particular del espacio es fácilmente resuelto si consideramos un sistema compuesto por dos bobinas (fig. 2.3) sistema conocido popularmente como bobinas de Helmholtz.

$$B = \frac{\mu_0 * N * I * R^2}{2 * \sqrt{(R^2 + H^2)^3}} \quad (2.3)$$

El propósito de las bobinas de Helmholtz es generar una zona del espacio donde el campo magnético sea prácticamente uniforme, lo que se logra cuando las dos bobinas de

radio R están separadas exactamente por una distancia R . Veremos a continuación que con esta separación se produce una zona donde el campo magnético generado es relativamente uniforme, zona aproximadamente igual al 10 % del radio de las bobinas y localizada en el medio del par de bobinas de Helmholtz.

Las bobinas de Helmholtz consisten en un par de bobinas ubicadas en forma paralela, alineadas de modo que sus centros coincidan con el eje de simetría de la bobina opuesta, y conectadas entre si en un circuito en serie (Fig. 2.3-b). Para la generación de un campo magnético uniforme, ambas bobinas deben tener el mismo número de vueltas, y la intensidad y dirección de la corriente debe ser la misma en ambas bobinas.

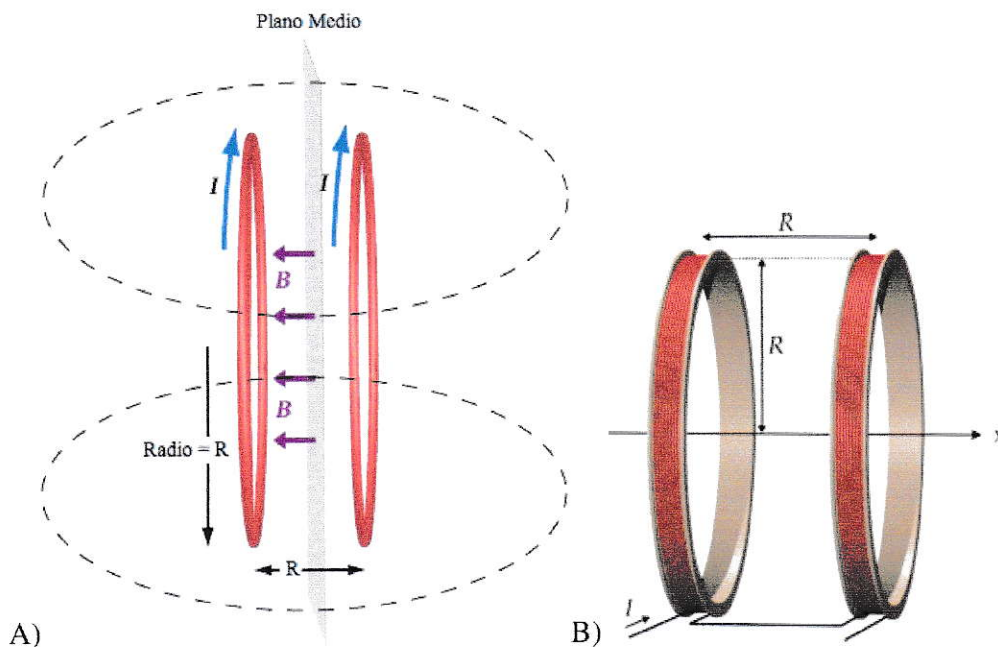


Figura 2.3: Bobinas de Helmholtz

A) En el diagrama se observa un plano imaginario paralelo a las bobinas de Helmholtz, este plano se encuentra a una distancia de $R/2$ siendo R la separación entre las bobinas y también el radio de estas.

B) Esquema de la configuración de dos bobinas formando un sistema de bobinas de Helmholtz, donde se aprecia claramente que la razón radio-separación de las bobinas es uno, ya que con esta configuración se obtiene la mayor área con un campo magnético uniforme sobre el eje que une ambos centros de las bobinas cuando el eje intercepta al plano imaginario (A).

La ecuación 2.4 describe el comportamiento de la intensidad del campo magnético sobre un plano imaginario paralelo a las dos bobinas de Helmholtz, ubicado en medio de ambas bobinas (Fig. 2.3-a). Debido a la simetría cilíndrica de las bobinas, sólo es necesario saber como se comporta la intensidad del campo magnético a lo largo del radio medido desde el eje que une co-linealmente ambos centro de las bobinas y que se ubica sobre el plano imaginario. La ecuación 2.5 describe la intensidad del campo en función de la variación del radio desde el centro de las bobinas:

$$B(r) = NI * (10^{-3}) * \int_0^{2\pi} 2a(a - r \cos(\theta)) d\theta / (a^2 + b^2 + r^2 - 2a * r * \cos(\theta))^{3/2} \quad (2.4)$$

En la ecuación 2.4, B representa la intensidad del campo magnético, N el numero de vueltas de la bobinas individuales (ambas bobinas de igual embobinado), I la corriente que circula a través de las bobinas, a el radio de las bobinas (ambas bobinas de igual radio), y b la separación media entre las bobinas (todas las unidades en SI, pero con el factor 10^{-3} cambia las unidades del campo magnético a gauss).

Como se muestra a continuación, para tener un campo magnético uniforme es de vital importancia definir adecuadamente la separación entre las bobinas, la que debe ser igual al radio de las bobinas.

En la figura 2.4 se aprecia como varía la uniformidad del campo magnético generado en medio de las bobinas de Helmholtz sobre un plano paralelo a las bobinas, en forma radial desde el eje que une ambas bobinas. Debido a la simetría cilíndrica que presenta el Campo Magnético Artificial, lo que en la figura 2.4 se ve como una curva es en realidad una superficie de revolución, donde el área homogénea corresponde a un círculo con un radio de aproximadamente un 10 % del radio de las bobinas cuando la separación entre las bobinas es igual al radio de las mismas (configuración óptima de las bobinas de Helm-

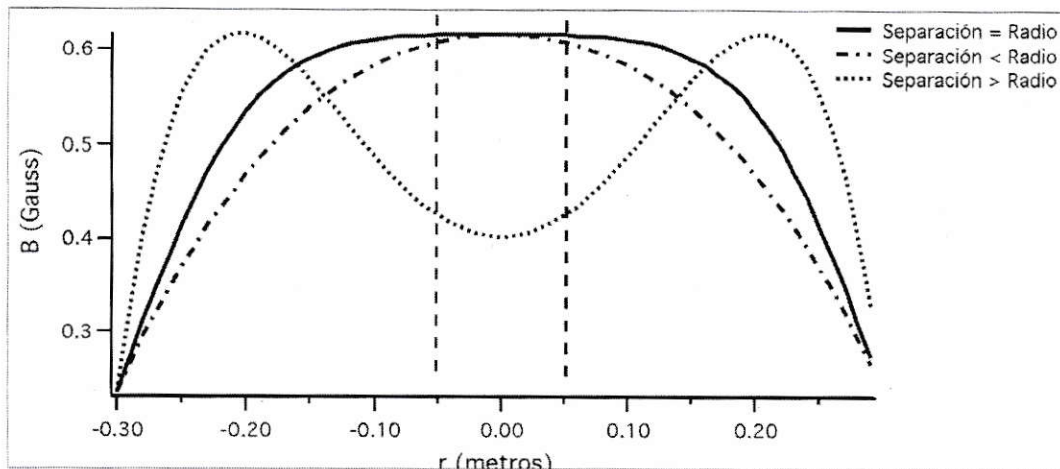


Figura 2.4: Distribución del Campo Magnético como función de la separación de las bobinas de Helmholtz

En la figura se observa un modelo hecho con los parámetros reales de una de las bobinas de Helmholtz utilizada en la tesis (55 cm de radio). Se grafican distintas distribuciones de intensidad del Campo Magnético Artificial sobre el plano que separa al par de bobinas de Helmholtz (fig.2.3-a). El gráfico muestra la intensidad vs. la distancia radial desde el eje que cruza ambos centros de las bobinas, por ello la simetría que se observa en las tres curvas.

Las curvas representan la relación separación-radio bobina. La línea continua representa la distribución de intensidad del Campo Magnético Artificial, con una separación de las bobinas igual a su radio (configuración óptima de las bobinas de Helmholtz). La curva punteada corresponde al caso en que la separación es mayor al radio, y la curva segmentada corresponde al caso en que la separación es menor al radio. En los tres casos se ve claramente como decae rápidamente la intensidad del campo magnético en una posición cercana a los 30 cm de radio. Se observa además un área homogénea de aproximadamente 5 cm de radio en el caso de la configuración óptima.

holtz). En caso de tener una separación distinta al radio de las bobinas, la uniformidad del campo magnético artificial disminuye considerablemente.

De acuerdo a lo anterior, la expresión para la intensidad del campo magnético sobre el eje central que une las bobinas de Helmholtz en el punto medio entre ambas bobinas, puede ser simplificada como se muestra en la expresión 2.5 si consideramos que el radio es igual a la separación de la bobinas:

$$B = \frac{32\pi NI}{a * 5^{3/2}} [mG] \quad (2.5)$$

Donde B es la intensidad del campo magnético, N es el número de vueltas de una de las bobinas de cada par, I es la corriente que circula por cada par bobina y a es el radio de las bobinas.

Así, para definir un Campo Magnético Artificial arbitrario se requieren tres pares de bobinas de Helmholtz.

Las características de los tres pares de bobinas de Helmholtz construidas son:

- El primer par de bobinas es de 30[cm] de radio y con un embobinado de 21 vueltas, y controla el campo magnético alineado con el eje norte-sur.
- El segundo par de bobinas es de 40[cm] de radio y con un embobinado de 27 vueltas, y controla el campo magnético alineado con el eje vertical.
- El tercer par de bobinas es de 55[cm] de radio y con un embobinado de 36 vueltas, y controla el campo magnético alineado con el eje este-oeste.

Con estas medidas de las bobinas de Helmholtz se pudo obtener una región del espacio lo suficientemente grande como para generar un Campo Magnético Artificial uniforme alrededor de la cabeza de la paloma. En esta tesis, debido a problemas de espacio en la sala de registro electrofisiológico, no fue posible implementar un sistema de bobinas Helmholtz más grandes ya que para generar un cubo de arista 20 cm (donde el campo magnético generado fuese relativamente constante) se requerirían bobinas de unos 2 metros de radio y con una separación también de 2 metros. Sin embargo, algunos laboratorios que trabajan en temas relacionados con biomagnetismo han logrado implementar sistemas de bobinas de estas dimensiones (Ritz y col. [2009]).

2.2. Medición del Campo Magnético

La generación de un campo magnético con las características deseadas resuelve sólo parte del problema, ya que como lo muestra la Ec.2.5 el campo magnético varía en forma lineal con la variación de la intensidad de corriente eléctrica en las bobinas (La intensidad de la corriente eléctrica varía entre -3 a 3 amp). Esto en la práctica es un problema porque la intensidad de corriente eléctrica puede variar de formas no deseadas debido a múltiples factores:

- I. Fluctuaciones en la fuente (problemas con el circuito amplificador de potencia) de poder que alimenta a las bobinas.
- II. Errores de programación en el software que controla la intensidad de corriente en las bobinas.
- III. Descarga repentina de las baterías que alimentan a las bobinas.

Estas variaciones del campo magnético pueden ser detectadas con sensores especializados. En esta tesis se usó un sensor magnético magneto-resistivo (permalloy) para monitorizar en forma continua y en tiempo real el campo magnético alrededor de la cabeza de la paloma.

Como mencionamos anteriormente el campo magnético terrestre se ve alterado por múltiples factores, siendo uno de ellos los grandes yacimientos de minerales magnéticos. Aunque nuestro montaje no presenta este problema, sí presenta un problema similar a una menor escala: el efecto de concentraciones de metal con alta susceptibilidad magnética en torno al lugar donde se desea medir la intensidad del campo magnético total. Este punto es relevante debido a que el aparato estereotáxico donde se lleva a cabo el experimento está hecho casi en su totalidad de metal sensible a campos magnéticos. Este hecho genera importantes variaciones en las líneas de campo magnético sobre el estereotáxico, a tal punto

que los ángulos de declinación e inclinación del campo magnético terrestre varían considerablemente cuando son medidos cerca del aparato. Por lo anterior, es de suma importancia poder *generar* y *medir* el campo magnético con precisión adecuada, objetivo fundamental del sensor magnético utilizado (Sensor Tri-axial Honeywell modelo HMC2003).

2.2.1. Sensor Magnético

El sensor magnético HMC2003 (ver Fig. 2.5) está compuesto por tres transductores magneto-resistivos de permalloy (aleación de Niquel-Hierro), uno para cada eje. Este sensor es capaz de medir el campo magnético en cada uno de los tres ejes en forma independiente, con un rango que varia entre -2 a 2 [Gauss] y con una sensibilidad de 1[Volt/G]. El sensor entrega como señal de salida un voltaje proporcional al campo magnético medido cuyo rango va desde 0,5 - 4,5 [volts], lo que significa que el cero del sensor magnético (0 gauss) corresponde 2,5 volts.



Figura 2.5: Sensor Magnetico

Sensor magnético Honeywell HMC2003 de tres ejes. Este sensor nos permite registrar en tiempo real el campos magnéticos débiles, en un sistema coordenadas cartesiano, con intensidades menores a 2 Gauss (campo magnético terrestre).

Como el sensor mide con precisión campos magnéticos en un rango entre -2 a 2 [G], si éste se ve expuesto a un campo magnético $\geq 2[G]$ éste pierde la sensibilidad que trae de fabrica. El diseño del sensor permite recuperar la sensibilidad original en forma sencilla, haciendo pasar un pulso de corriente como se muestra en la Fig.2.7 a través del sensor. Para la generación de este pulso fue necesario construir un pequeño circuito eléctrico (Fig.2.6)

controlado por un microprocesador (Arduino) el cual es capaz de generar las dos señales (Set y Reset) que aparecen en la Fig.2.7 (Arduino es un microprocesador programable desde cualquier plataforma computacional, de manera simple bajo lenguaje C).

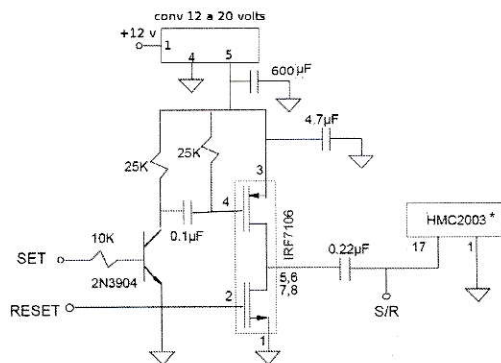


Figura 2.6: Diagrama circuito de reseteo sensor magnético

Diagrama electrónico de reseteo (reset) del sensor magnético, cuya aplicación es calibrar el sensor magnético principalmente por someter el sensor magnético a la proximidad de fuentes magnéticas superiores a 2 [Gauss] (principalmente campos magnéticos provenientes de imanes).

2.2.2. Sistema de adquisición de datos y control

2.2.2.1. Generación y adquisición de datos

Para la generación de datos que controlan el Campo Magnético Artificial (mediante un circuito amplificador de potencia), y la adquisición de datos provenientes del sensor magnético y del electrodo (1 ó 16 canales). Es necesario contar con un sistema adecuado para el desarrollo de los experimentos de biomagnetismo.

- En el caso de adquisición de datos se contó con:

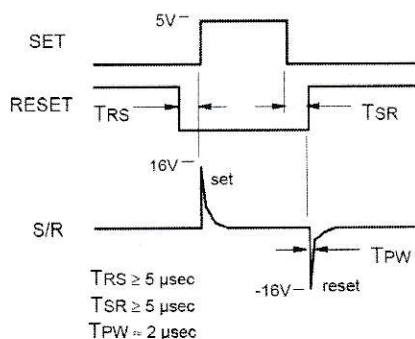


Figura 2.7: Pulsos generado por el circuito de reseteo

Los dos pulsos de la parte superior (*set* y *reset*) se deben introducir al circuito de reseteo (fig.2.6); estos pulsos son generados por el microprocesador Arduino. De la salida del circuito se observa la señal (*s/r*) requerida por el sensor magnético para volver a obtener su sensibilidad de fabrica.

- I. Un electrodo de 16 canales y un electrodo de 1 canal
- II. Un amplificador de señales extracelulares (A-M Systems Model 1800 de 2 canales y A-M Systems Model 3600 de 16 canales)
- III. Tarjeta National Instruments BNC-2090 de 16 entradas análogas
- IV. Software Igor-Pro (para controlar las entradas y salidas de la tarjeta National Instruments)
- V. Sensor magnético Tri-axial Honeywell modelo HMC2003

Las entradas análogas (16 en total) de la tarjeta de adquisición (iii) fueron administradas del siguiente modo: 13 canales se utilizaron para los registros extracelulares (luego de pasar por un amplificador de señales (ii)) y los 3 canales restantes se utilizaron para adquisición de datos del sensor magnético (v). Todo el proceso de adquisición de datos se realizo utilizando el software Igor-Pro (iv).

- En el caso de la generación de datos para controlar el Campo Magnético Artificial se utilizó:

- I. Tarjeta National Instruments BNC-2090 (la misma utilizada para la adquisición de datos), con 8 salidas digitales y 2 salidas análogas.
- II. Un circuito amplificador de potencia (fig. 2.9), controlado por el programa Igor-pro a través de la tarjeta National Instruments.

Para esquematizar el montaje de la adquisición y generación de datos se presenta el siguiente diagrama (Fig. 2.8):

- Las señales de las 2 salidas análogas van al circuito amplificador de potencia utilizado para alimentar las bobinas Helmholtz (estas dos señales generan el vector campo magnético en el eje vertical y el vector campo magnético en eje horizontal, con orientación Este-Oeste).
- La señal para la tercera bobina de helmholtz utiliza las 8 salidas digitales las que van a un conversor digital-análogo (D-A) de 8 bits. La señal del conversor D-A es la que llega al amplificador de potencia para alimentar el par de bobinas de Helmholtz restante (que genera el vector campo magnético en el eje horizontal, con orientación Norte-Sur).

De esta manera son controlados los tres pares de bobinas que generan vectores de Campo Magnético Artificial ortogonales entre si, obteniendo de esta forma un sistema de coordenadas cartesianas que nos permite definir cualquier vector magnético (vector magnético terrestre + vector magnético artificial) en el espacio de una manera simple.

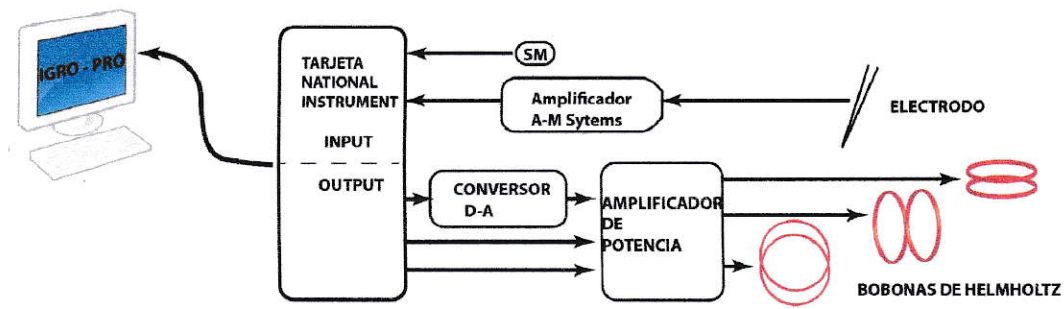


Figura 2.8: Diagrama del Sistema de Adquisición y Generación de datos

En el diagrama se esquematiza el sistema de adquisición de datos (electrodo y sensor magnético “SM”) y la generación de datos para tres pares de bobinas de Helmholtz. Todo esto es controlado mediante el PC (software Igor-Pro) a través de la tarjeta National Instruments.

2.2.2.2. La tarjeta de adquisición de datos

La tarjeta de adquisición National Instruments permite adquirir y generar datos en un rango de voltaje entre -5 a 5 [V]. Esto es suficiente para el desarrollo de nuestros experimentos, ya que este trabajo se enfoca en los efectos del Campo Magnético Terrestre. Donde los datos adquiridos por la tarjeta de adquisición provenientes del output del sensor magnético se encuentran entre 1.5 - 3.5 [V], lo que corresponde a un campo magnético entre -1 y 1[G] y en el caso de la generación del campo magnético se generan señales que se encuentran entre -4 a 4 [V]. La implementación del sensor magnético junto con la tarjeta de adquisición National Instruments nos permite obtener una precisión de ~ 0.1 [mG] en la medición del campo magnético. Para la adquisición de los registros extracelulares la señal registrada por la tarjeta de adquisición se encuentra entre -2 a 2 [V].

2.2.2.3. Generación de la corriente eléctrica

Como se mencionó anteriormente, la generación del campo magnético se realiza usando tres sets de bobinas de Helmholtz, siendo el campo magnético generado proporcional a la intensidad de corriente eléctrica que circula por cada par de bobinas. Para la generación de corriente continua se usó un circuito amplificador de potencia (Fig 2.9), alimentado por

dos baterías de 12 volts de 55 amp/hr, la intensidad de corriente varía en un rango entre -3 a 3 amp, en forma simultánea para a los tres pares de bobinas. Se utilizan baterías ya que estas generan corriente continua lo que se traduce en la generación de un campo magnético continuo y no generan el ruido de 50 Hz que produce cualquier equipo conectado a la red eléctrica, ruido que afecta considerablemente los registros extracelulares debido a que este tipo de registros tienen una pequeña amplitud peak-to-peak (aprox. $400\mu V$). El circuito amplificador de potencia recibe como input tres señales análogas para alimentar cada par de bobinas de Helmholtz de forma independiente (el input varía entre ± 5 volts, los que son generados por la tarjeta de adquisición de datos), siendo el output del circuito un voltaje proporcional al voltaje de entrada. Entonces la corriente que circula por cada par de bobinas de Helmholtz depende de la resistencia de cada par de bobinas (lo que significa que el voltaje de salida de amplificador de potencia es proporcional al campo magnético generado por cada par de bobinas de Helmholtz). Como se mencionó anteriormente, dos de los inputs llegan directamente de la tarjeta de adquisición de datos (salidas análogas) y el tercer input llega desde un circuito conversor digital-análogo de 8 bit (fig. 2.9), debido al uso de las salidas digitales de la tarjeta National Instruments, para controlar el tercer par de bobinas.

Los campo magnéticos producidos artificialmente requieren de mucha precisión para su generación, es por esto que es necesario controlarlos en forma automática. Para esto se escribió un programa en Igor-Pro (software que controla la tarjeta de adquisición) generando un Campo Magnético Artificial opuesto al Campo Magnético Terrestre en la zona del espacio donde se ubica la cabeza de la paloma, "anulando" así la influencia del Campo Magnético Terrestre. Luego de esto se genera el Campo Magnético Artificial que se desea evaluar en el experimento, lo que en la práctica se logra controlando las distintas componentes ortogonales del vector campo magnético generadas por los tres pares de bobinas de Helmholtz.

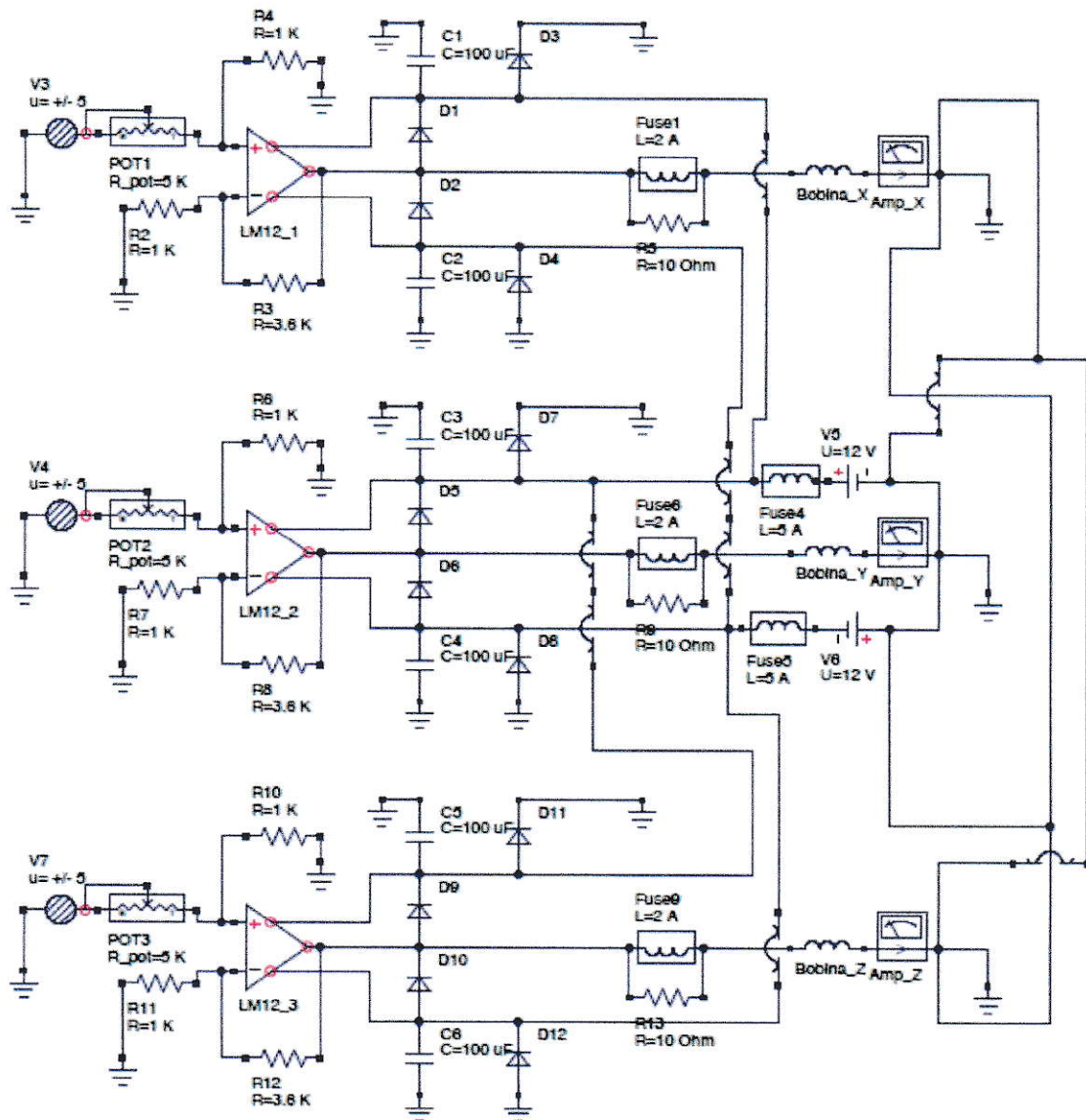


Figura 2.9: Circuito Amplificador de Potencia

Diagrama del circuito amplificador de potencia empleado para suministrar corriente continua a los tres pares de bobinas de Helmholtz. La implementación de este circuito se debió a que se necesitaba suministrar corriente continua, y no alterna, para generar un Campo Magnético Artificial continuo. Se utilizó amplificadores operacionales de potencia para controlar la corriente de orden 1-3 amp de un par de baterías de 7 amp/hr (posteriormente reemplazadas por un par de baterías de 55 amp/hr).

2.2.3. Calibración del sensor magnético

La calibración se lleva a cabo midiendo el módulo, ángulo de inclinación y ángulo de declinación del Campo Magnético Terrestre con el sensor magnético, y luego comparando las mediciones con los valores conocidos del Campo Magnético Terrestre en Santiago de Chile. A continuación se detalla el procedimiento realizado para la calibración:

1. El sensor magnético se fija sobre una plataforma horizontal que rota sólo sobre su eje vertical. El sensor puede fijarse en la plataforma en distintas posiciones, de modo que al rotar la plataforma el sensor pueda rotar sobre sus ejes X, Y o Z (según posición de fijado). Todas las mediciones se hacen blindando el sensor con Mu-metal (detalles más adelante).

2. Se registra la intensidad del Campo Magnético Terrestre en la sala de registro rotando el sensor magnético sobre sus tres ejes consecutivamente, sin y con un blindaje de Mu-metal, de acuerdo al siguiente protocolo :
 - 2a) Se hace coincidir el eje X del sensor con el eje N-S geográfico y el eje Y del sensor con el eje O-E geográfico. Comenzando en 0° (dirección Norte), se rota el sensor magnético sobre su eje Z en 10° en sentido horario hasta completar 360° .
 - 2b) Se hace coincidir el eje X del sensor con el eje N-S geográfico y el eje Z del sensor con el eje O-E geográfico; se repite el procedimiento anterior rotando el sensor magnético sobre su eje Y.
 - 2c) Se hace coincidir el eje Z del sensor con el eje N-S y el eje Y del sensor en el eje O-E; se repite el procedimiento anterior rotando el sensor magnético sobre su eje X.

El alineamiento de los ejes del sensor magnético con los ejes geográficos se lleva a cabo utilizando la orientación de los muros de la sala de registro del laboratorio, ya que

fueron construidos siguiendo la orientación Norte-Sur y Este-Oeste.

Una parte importante del proceso de calibración es poder definir el “cero” del sensor magnético, que corresponde al output del sensor magnético cuando no hay campo magnético alguno. Para ello se utiliza una aleación magnética conocida como Mu-metal, la cual permite blindar al sensor magnético de los campos magnéticos externos.¹ El Mu-metal (Jiles [1998]) es una aleación compuesta básicamente de níquel-hierro (75 % níquel, 15 % hierro) que además tiene una pequeña cantidad de cobre y molibdeno. En general las aleaciones de níquel-hierro tienen una alta permeabilidad magnética μ (permeabilidad magnética del Mu-metal 20000-100000 μ_r , siendo μ_r la permeabilidad relativa), lo que les permite conducir las líneas del campo magnético. Cabe notar que existen aleaciones con permeabilidades magnéticas mayores a las del Mu-metal, pero éstas son más difíciles de adquirir y también son menos maleables.

A continuación se muestran los gráficos de calibración del sensor magnético blindado con Mu-Metal, utilizados para calcular el cero del sensor magnético.

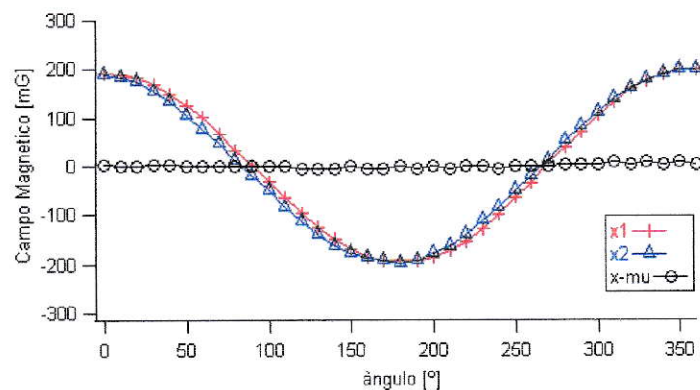


Figura 2.10: Calibración sensor magnético eje X

La curva azul(Δ) y roja(+) representan el output del eje X del sensor magnético según los pasos 2a y 2b respectivamente, donde se observa una forma sinusoidal en ambas curvas. La curva negra (o) representa los datos obtenidos del output del sensor magnético del eje X al blindar al sensor con Mu-metal.

¹Este blindaje funciona con un principio radicalmente distinto de la llamadas “Jaulas de Faraday” que se usan para blindar campos eléctricos.

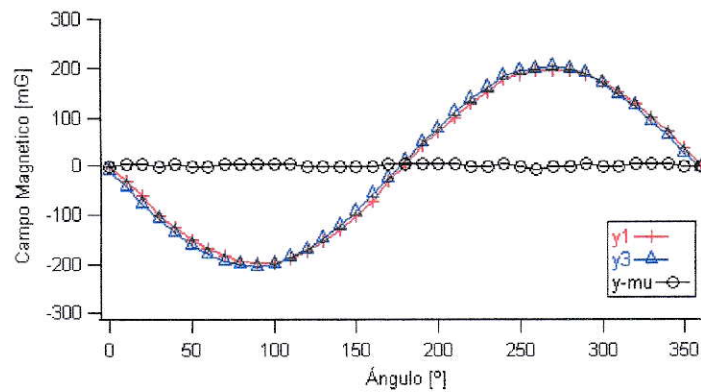


Figura 2.11: Calibración sensor magnético eje Y

Las curvas azul(Δ) y roja(+), representan el output del sensor magnético del eje Y según los pasos 2a y 2c respectivamente, donde se observa que ambas curvas tienen una forma sinusoidal. La curva negra (o), representa los datos obtenidos del output del sensor magnético del eje Y al blindar el sensor con mu-metal.

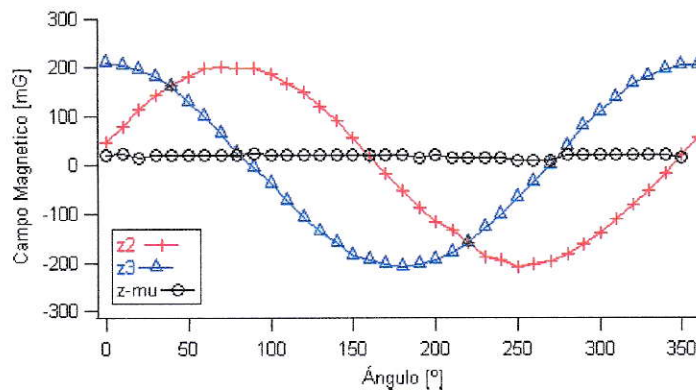


Figura 2.12: Calibración sensor magnético eje Z

La curva azul(Δ) y roja(+), representan el output del sensor magnético del eje Z según los pasos 2b y 2c respectivamente, se observa que ambas curvas tienen una forma sinusoidal. La curva negra (o) representa los datos obtenidos del output del sensor magnético del eje Z al blindar al sensor con Mu-metal.

Observando las figuras 2.10, 2.11 y 2.12 vemos las curvas negras que representan el output del sensor magnético blindado con Mu-metal. Nos damos cuenta que el Mu-metal realmente bloquea el campo magnético ya que en los tres ejes del sensor magnético tenemos un output que es prácticamente 0 [G]. Las curvas rojas y azules representan el output del sensor magnético midiendo la componente horizontal del campo magnético terrestre que en Santiago es de aproximadamente 0. 2019 [G]. El sensor magnético nos entregó una lectura de ~ 0.200 [G] para la componente horizontal del campo magnético terrestre, valor que fue ratificado por los tres ejes en forma independiente. Podemos así afirmar que el sensor magnético HMC2003 mide la intensidad de campo magnético de forma adecuada y en cada uno de sus ejes en forma independiente.

2.2.3.1. Linealidad de las bobinas de helmholtz

Para la evaluación del funcionamiento de las bobinas lo primero que se hizo fue hacer un barrido de $-1[\text{amp}]$ a $+1[\text{amp}]$ para verificar la linealidad del campo magnético generado en el centro las bobinas. Este procedimiento se realizó primero con los tres pares de bobinas independientemente y luego con los tres pares de bobinas simultáneamente, para determinar cuan ortogonales eran entre si los campos magnéticos generados por las distintos pares de bobinas.

En las figuras 2.13, 2.14 y 2.15 las curvas azules representan el output del sensor magnético bajo la influencia del campo magnético generado por cada par de bobinas en forma independiente para los ejes X, Y y Z, respectivamente. Se observa que las curvas se comportan de forma lineal, cumpliéndose la ecuación 4 que plantea que el campo magnético es proporcional a la corriente aplicada en las bobinas. Esta confirmación nos permite decir que experimentalmente se puede obtener un campo magnético uniforme en el centro de cada par de bobinas, y de esta manera obtener un sistema de coordenadas magnéticas ortogonales.

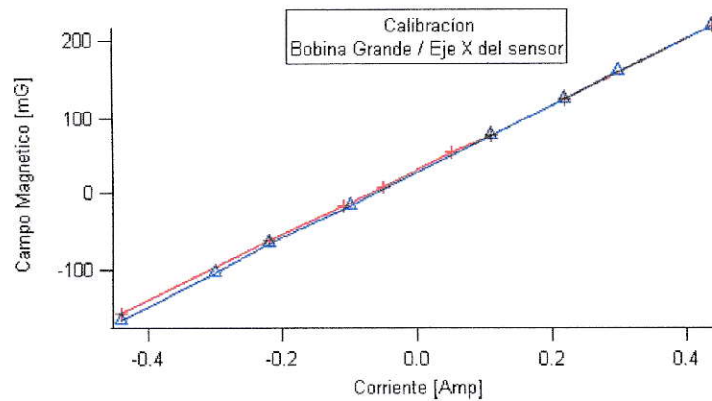


Figura 2.13: Calibración bobina eje X

En azul se aprecia el campo magnético artificial orientado en el eje Este-Oeste geográfico (output del eje X del sensor magnético). Y en rojo se adiciona el efecto de los dos campos magnéticos ortogonales restantes: el campo magnético en el eje Norte-Sur y eje vertical (correspondientes al output de los ejes Z e Y del sensor magnético).

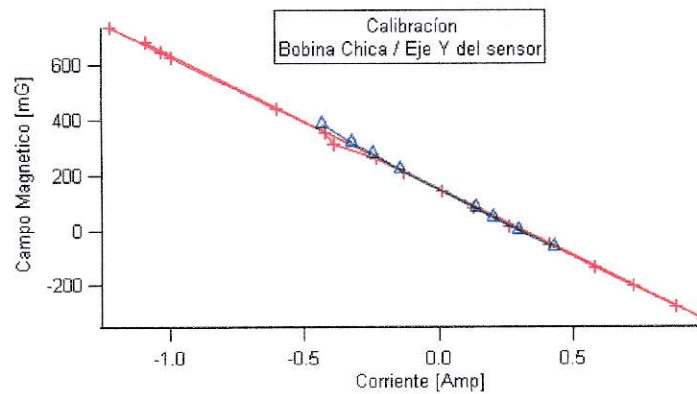


Figura 2.14: Calibración bobina eje Y

En azul se aprecia el campo magnético artificial orientado en el eje Norte-Sur geográfico (output del eje Y del sensor magnético). Y en rojo se adiciona el efecto de los dos campos magnéticos ortogonales restantes: el campo magnético en el eje Este-Oeste y eje vertical (correspondientes al output de los ejes Z e X del sensor magnético).

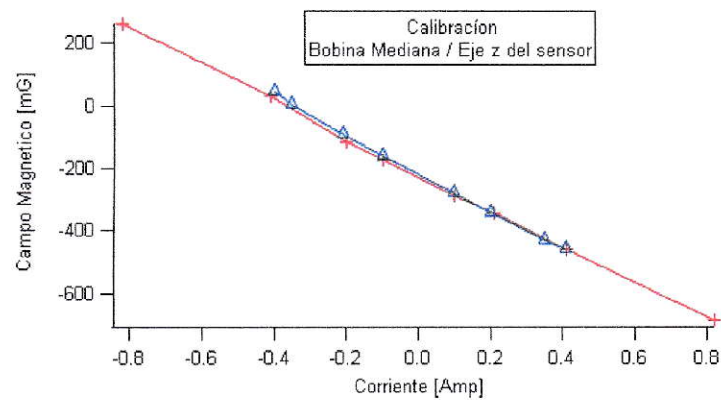


Figura 2.15: Calibración bobina eje Z

En azul se aprecia el campo magnético artificial orientado en el eje vertical (output del eje Z del sensor magnético). Y en rojo se adiciona el efecto de los dos campos magnéticos ortogonales restantes: el campo magnético en el eje Norte-Sur y eje Este-Oeste (correspondientes al output de los ejes X e Y del sensor magnético).

Al superponer los campos magnéticos generados por los tres pares de bobinas simultáneamente, se aprecia en los tres gráficos pequeñas variaciones de la lectura del sensor magnético. A pesar de estas variaciones la medición se comporta de manera lineal, significando que la superposición de los tres campos magnéticos artificiales (y ortogonales) no genera grandes perturbaciones en el campo magnético total generado. Entonces, para efectos del desarrollo de los experimentos de esta tesis, el campo magnético total generado por los tres pares de bobinas de Helmholtz es adecuado y su intensidad (a pesar de ser un campo débil) es medible con precisión mediante el sensor magnético. Esto es de suma relevancia, ya que a mayor precisión en la generación del campo magnético, mayor es la reproducibilidad (y confiabilidad) de los experimentos.

2.3. Ejecución De Registros Intracelulares In-Vivo motivados por el fenómeno de la magnetorecepción en aves

2.3.1. Primera Parte del Procedimiento Experimental

2.3.1.1. Preparación de las paloma para la realización de los experimentos.

Los experimentos se realizaron en palomas comunes (*Columba livia*) y en palomas mensajeras, ocupando 20 y 3 palomas respectivamente. Las masas de las palomas variaron entre 300 y 480 gr. Los experimentos se realizaron bajo dos condiciones principales:

- Paloma anestesiada
- Paloma despierta

Palomas anestesiadas. Se utilizó 17 palomas comunes a las cuales se les aplicó uno de los dos protocolos de anestesia que se describen a continuación:

1. - Uretano al 20 % (Ure) en agua destilada (n=5 palomas). Se inyecta una dosis intramuscular de 3 ml de Ure para un peso aproximado de 300 gr; en caso que la paloma continúe consciente después de media hora, se inyecta una segunda dosis de 0.03 ml. Con este protocolo se intentó reproducir lo más cercanamente posible el protocolo de Semm y Demaine, 1986.
2. - Ketamina 10 % (Ket) 1.5 ml y xilacina 2 % (Xil) 0.7 ml (n=12). Se inyecta una dosis intramuscular de 0.35 ml de la solución descrita para un peso de aproximadamente 330 gr. A diferencia del Ure, con la mezcla Ket-Xil es necesario inyectar constantemente una dosis de 0.03 ml cada 1,5 hrs hasta el final del experimento.

Esta anestesia es la que se usa con mayor frecuencia en el laboratorio donde se llevo a cabo esta tesis, en los trabajos con palomas, debido a que la mezcla de ketamina y xilacina, a diferencia de la anestesia con uretano, permite obtener una rápida recuperación de la actividad y conciencia en las palomas luego de la última dosis de mantención de la anestesia.

Cualquiera sea el protocolo de anestesia utilizado, la paloma debe dejarse en ayuno la noche anterior al experimento, para evitar la regurgitación de granos durante el desarrollo del mismo. Las palomas ya anestesiadas se ubican en un estereotaxico metálico (Fe) donde se les fija la cabeza para evitar su movimiento. Esto se lleva a cabo fijando la paloma por los orificios auriculares a través del siguiente procedimiento: se cortan las plumas de los orificios auriculares y se cubren con lidocaína en gel (anestésico) antes de fijar la cabeza en el estereotaxico. Para que la cabeza quede en una posición adecuada para el acceso a estructuras neuroanatómicas, también debe fijarse el pico de la paloma (ver la fig:2.16). Esta posición permite determinar con gran precisión la posición de los distintos núcleos del cerebro, lo cual es indispensable para la reproducibilidad experimental. Esta es la posición estándar *de facto* de acuerdo a la publicación (1967) del Atlas Estereotáxico de la Paloma Karten y Hodos [1967].

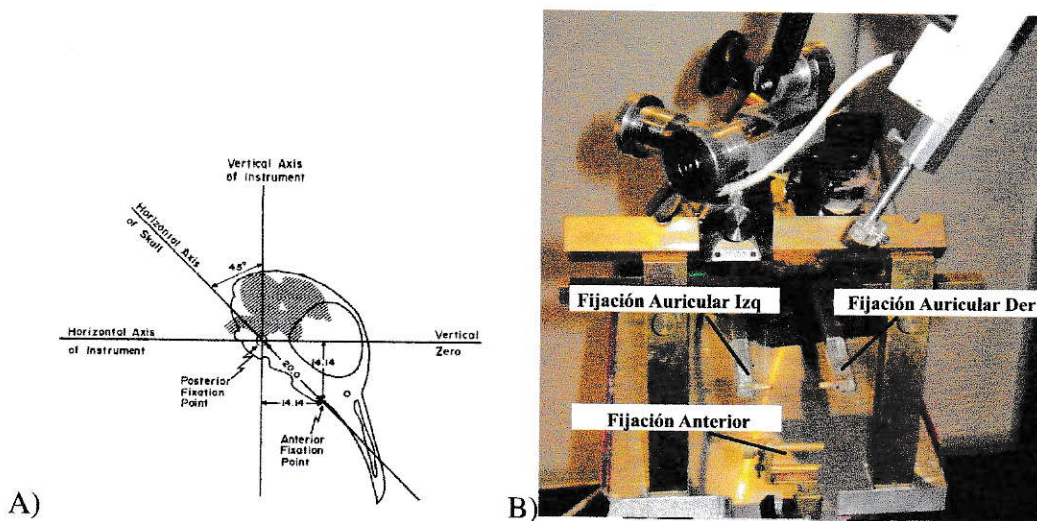


Figura 2.16: Diagrama de paloma en estereotaxico

A) Imagen sacada del "A STEREOTAXIC ATLAS OF THE BRAIN OF THE PIGEON" (Karten y Hodos [1967]), donde el punto de fijación posterior corresponde a los oídos de la paloma y el punto de fijación anterior corresponde a una hendidura en el pico de las palomas. De este modo, se determina una posición estándar considerando la morfología del cráneo y el estereotáxico.

B) Imagen del estereotáxico usado en el experimento, donde se aprecian claramente los dos puntos de fijación posteriores, uno derecho y uno izquierdo, y el punto de fijación anterior.

Durante la anestesia la paloma sufre una rápida caída de temperatura. La mantención de la temperatura interna de la paloma en el rango 39-40 °C (temperatura normal de la paloma) es lograda usando una manta térmica, que es regulada automáticamente a través de una termocupla instalada en la cloaca de la paloma. Para asegurarse que la paloma se encuentre en buen estado y correctamente anestesiada, es necesario una monitorización continua de la actividad cardiaca mediante un electro-cardiograma (ECG). Se utiliza un registro diferencial con dos electrodos de ECG, que se sitúan en el músculo del ala izquierda y en la extremidad inferior derecha.

Los registros en palomas anestesiadas se hicieron solo en el TO, donde contamos con dos alternativas: el tectum óptico derecho, que recibe axones retinianos sólo del ojo izquierdo, y el tectum óptico izquierdo, que recibe axones retinianos solo del ojo derecho.

Existe literatura (Liedvogel y col. [2007], Wiltschko y col. [2002]) que habla sobre la lateralización del tectum óptico en las palomas, afirmando que la sensibilidad magnética se ubica principalmente en el tectum izquierdo (Wiltschko y col. [2002]). Por este motivo en esta tesis los registros fueron preferentemente en el tectum izquierdo, aunque de todos modos se realizó algunos registros en el tectum derecho.

Para acceder al TO se abre un pequeño orificio (de aproximadamente 5 mm de diámetro) en el cráneo de la paloma en la parte lateral posterior. A través del orificio se observa claramente el TO, y se puede así introducir un electrodo de tungsteno (con una resistencia de $\sim 1M\Omega$) en forma radial. El registro se realiza a diferentes profundidades para poder registrar distintas capas del TO, y las profundidades varían típicamente entre 0.23- 2 [mm] medido desde la superficie del TO. Una parte indispensable del circuito de registro es la definición de la tierra, la que en nuestro caso corresponde a una aguja en la musculatura del cuello de la paloma.

Paloma despierta. Se utilizaron 3 palomas comunes y 4 palomas mensajeras. Para llevar a cabo este tipo de registro, se reemplaza la fijación de los oídos descrita anteriormente por una fijación por pernos pegados en el cráneo con acrílico dental. El procedimiento de instalación de pernos se realiza al menos con un día de antelación al registro, para dar tiempo suficiente para la metabolización de la anestesia (Ket-Xil, de acuerdo al protocolo descrito en “palomas anestesiadas”) por parte de la paloma. El procedimiento es el siguiente: una vez anestesiada la paloma, se deja al descubierto el cráneo en la zona de la calota. Aquí se hace una cuadrícula de pequeños orificios (sin atravesar completamente el hueso) y se vierte acrílico dental. Antes de secarse el acrílico, se adhieren dos pernos verticales a través de los que la paloma se fijará al estereotaxico. Una vez seco el acrílico, se procede a dejar al descubierto la parte del cerebro que se desea registrar (forma análoga al método utilizado con palomas anestesiadas), en este caso el TO y el Ipc.

El procedimiento de introducción del electrodo en el TO es idéntico para palomas anes-

tesiadadas y palomas despiertas. Una vez que el TO es visible a través del agujero del cráneo, es necesario ubicar el electrodo de tungsteno en un mico-manipulador (ver Fig.2.17). El micro-manipulador es un aparato que permite fijar el electrodo y manipularlo con una precisión de un micrometro (μm), permitiendo ubicar al electrodo en la región que se desea registrar de acuerdo al mapa estereotáxico del cerebro de la paloma.

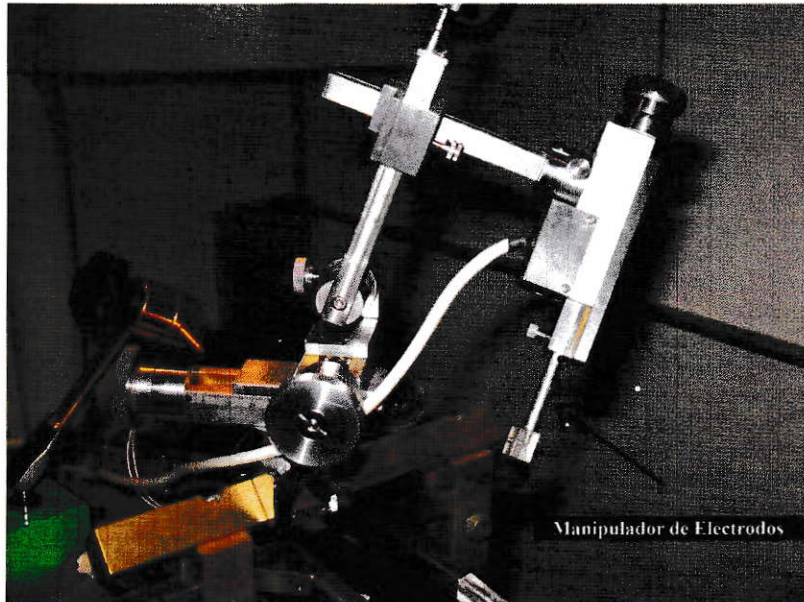


Figura 2.17: Manipulador de electrodos

En la foto se aprecia uno de los dos manipuladores para electrodos usados durante esta tesis, el cual se encuentra montado sobre el aparato estereotáxico. Este manipulador en particular era usado para montar electrodos de un único canal.

Una vez introducido el electrodo, es necesario determinar la cantidad de “ruido” del registro, debido a que la amplitud de las señales en los registros electrofisiológicos es muy pequeña ($\sim 200\mu V$). A pesar de que la sala está blindada con una jaula de Faraday, se debe en ocasiones blindar a la paloma con láminas de aluminio para lograr obtener un ruido eléctrico $\sim 100\mu V$, suficiente para evitar interferencia con las señales electrofisiológicas. Una vez que se obtiene una relación señal-ruido adecuada, es necesario amplificar la señal electrofisiológica. Para ello se utiliza un amplificador modelo Microelectrode AC amplifier model 1800 de 2 canales (A-M Systems), con una ganancia de $\times 1000$ y un filtro pasa

bandas entre 5Hz y 10kHz. La señal amplificada es direccionada a la tarjeta de adquisición National Instruments, la que es controlada por el programa Igor-Pro para análisis de señales, con una tasa de adquisición de datos de 10kHz.

Para la serie final de experimentos (palomas despiertas) se utilizó un nuevo modelo de amplificador (16-channel Microelectrode Amplifier Model 3600, A-M Systems). Gracias a que este modelo permite registrar 16 canales simultáneamente, se utilizó un electrodo de 16 canales (modelo Neuronexus) en un arreglo de 4x4 electrodos (4 agujas de 4 mm de largo separadas por 200 μm , donde cada aguja consta de 4 electrodos - ver Fig 2.18).

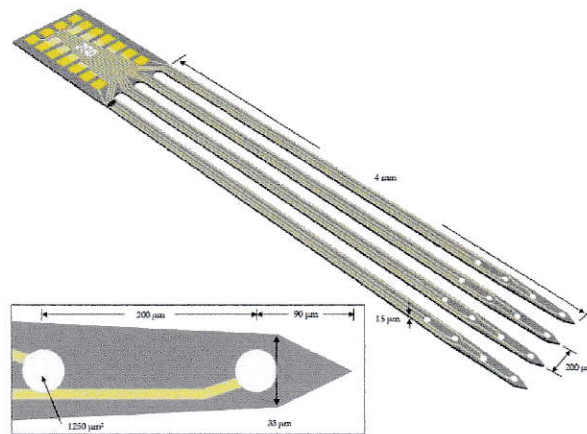


Figura 2.18: Eléctrodo de 16 canales

En la figura se presenta un esquema de las características del electrodo de 16 canales usados, donde se aprecian las dimensiones de las 4 agujas y distribución de los 4 electrodos en cada aguja, lo que realmente se resume en un arreglo de 16 electrodos separados por 200 μm .

Una vez introducido el electrodo en el TO es necesario determinar los campos receptivos de la paloma. El campo receptivo corresponde a la zona del espacio en que los estímulos visuales generan una respuesta eléctrica en las neuronas que están siendo registradas.

Como las palomas son capaces de detectar mínimos cambios en la intensidad de la luz dentro de su campo receptivo, se cubre toda el área del campo receptivo con una cortina

negra para evitar que se produzca estímulos visuales no deseados. Esto se logra dividiendo la sala de registro en dos, manteniendo la parte donde se encuentra la paloma aislada de todo estímulo visual que no sea parte del protocolo experimental.

2.3.2. Montaje del sistema de magneto-foto estimulación

Segunda Parte del Procedimiento Experimental

2.3.2.1. Montaje del sistema de estimulación magnética

Esta parte del procedimiento consiste en implementar los tres pares de bobinas de Helmholtz en torno al aparato estereotáxico una vez que la paloma se encuentra fija en el mismo. La disposición de las bobinas de Helmholtz es la siguiente:

- El par de bobinas de Helmholtz de menor diámetro (30[cm] de radio, con un embobinado de 21 vueltas), se ubican en forma paralela a un corte sagital de la cabeza de la paloma, de modo que ambos ojos intercepten el eje que une los centros de las bobinas (eje N-S en la Fig. 2.19). Esta posición genera un vector campo magnético que coincide con la orientación Norte-Sur geográfica, según la disposición del estereotáxico en el laboratorio.

- El par de bobinas de Helmholtz de diámetro medio (40[cm] de radio, con un embobinado de 27 vueltas), se ubican en forma paralela a un plano horizontal. Esta posición genera una vector campo magnético que coincide con un orientación vertical. El eje que une los centros de este par de bobinas debe interceptarse con el eje que une los centros del par de bobinas del punto anterior en el ojo que se desea estudiar (típicamente el centro de la región donde se generará un campo magnético relativamente uniforme será en el ojo derecho de la paloma).

- El par de bobinas de Helmholtz de mayor diámetro (55[cm] de radio, con un embobinado de 36 vueltas) se ubican en posición antero-posterior con respecto a la cabeza de la paloma. El vector campo magnético generado por el par de bobinas coincide con la

orientación Oeste-Este geográfica (eje E-O en la Fig.2.19).

La intersección de los vectores campo magnético generados por los tres pares de bobinas produce un sistema ortogonal centrado en uno de los ojos de la paloma. Una vez montado el sistema de bobinas de Helmholtz, se debe proceder a montar el sistema de foto-estimulación.

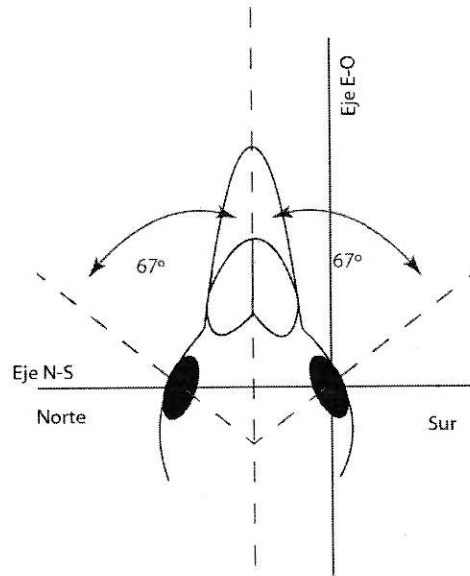


Figura 2.19: Eje óptico de la paloma

El diagrama muestra el eje óptico de la paloma (azul) formando un ángulo de 67° con el eje antero-posterior de la paloma. También se observa los eje definidos por dos de los pares de bobinas de Helmholtz: eje N-S y eje O-E, cada eje formado por las bobinas de 30 cm y 55 cm de radio respectivamente. Ubicando el origen del sistema ortogonal magnético en el ojo derecho de la paloma.

2.3.2.2. Montaje del sistema de foto estimulación

El montaje de foto-estimulación consiste en realizar estimulación bajo oscuridad y luz azul, verde, rojo y blanco. Para la implementación de los estímulos de luz azul, verde y rojo se utilizaron ampollitas de LED de longitud onda constante, la intensidad lumínica de las ampollitas de LED se mantuvieron constantes en todos los experimentos. En el caso de estimulación lumínica en oscuridad se realiza manteniendo la sala de registro en completa

oscuridad y para el caso de la utilización de luz blanca se deja entrar luz solar (a través de una ventana) a la sala de registro. Las ampollas de LED son alimentadas por baterías. Para asegurarse que la paloma no sea estimulada por estímulos lumínicos o auditivos los registros son realizados en silencio y el área de registro es cubierto con una cortina negra para evitar que la paloma las luces de computador o la luz del monitor.

2.4. Análisis de datos.

Dado que la estimulación magnética genera respuestas muy pequeñas (si las hay), se usaron varias técnicas para analizar datos, si se lograba detectar una respuesta asociada al estímulo magnético más allá del valor de un ruido estadístico.

En relación a su aspecto esencial, el análisis se centró en los componentes lentos de las respuestas (es decir, no en el análisis de espigas), y se usaron varias herramientas (descritas a continuación) para ver si la magnitud del componente lento variaba con el campo magnético aplicado.

2.4.1. Cuantificación de las respuestas.

Un problema recurrente en neurofisiología es cuantificar las respuestas neuronales. En muchas situaciones la cuantificación es simple ya que o aumenta la frecuencia de descarga de una neurona, o el componente lento (Local Field Potential o LFP) se incrementa en forma notoria y no hay discusión sobre la existencia de una respuesta asociada a una estimulación (ver Fig. 2.20). En esos casos no es necesario usar estadísticas complejas, un simple *histograma peri-estímulo* se utiliza para visualizar la tasa y el tiempo de las descargas de espigas neuronales en presencia de un estímulo externo. Este histograma

sirve para cuantificar trenes de espigas y en caso de LFPs la magnitud del potencial que describe la respuesta.

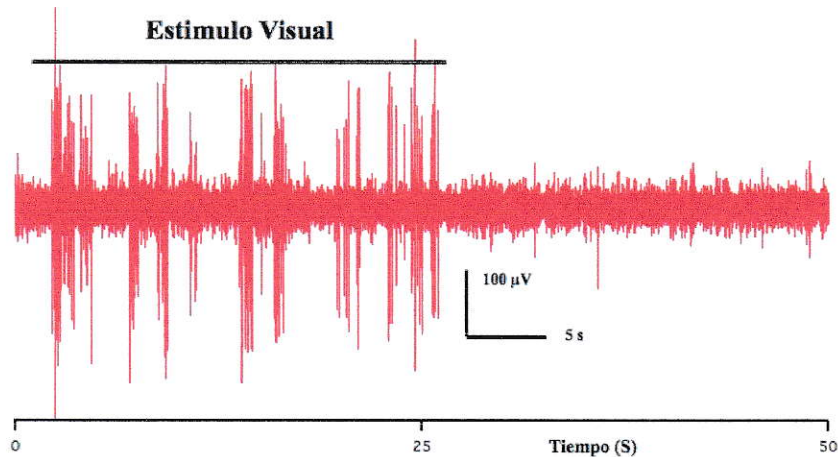


Figura 2.20: Estimulo Visual

El gráfico presenta un registro de actividad extracelular en el Tectum Óptico durante estimulación visual (en este caso un punto de luz cruzando el campo receptivo). Se ve claramente que durante la estimulación visual se genera actividad que desaparece cuando se detiene el estímulo (Línea sobre el registro).

En otras situaciones, sin embargo, aparecen problemas cuando la respuesta neuronal es de magnitud pequeña (frente a la presentación del estímulo) y/o presenta una gran variabilidad. En casos como estos, el análisis de una sola respuesta no constituye un método robusto para determinar si una neurona es o no sensible a un estímulo. En estos casos es necesario usar técnicas estadísticas más complejas que van desde la promediación de señales, hasta usar técnicas como la determinación de los intervalos de confianza. Desgraciadamente, nuestro trabajo de tesis se enfrentó a una de estas situaciones donde las supuestas respuestas neuronales a los campos magnéticos son de baja magnitud y gran variabilidad, si es que existen. Además hay que hacer notar que este problema es ya lo suficientemente conocido como para crear un subcampo de la estadística llamada *surrogate statistics* (estadísticas substitutas), que usa argumentos probabilísticos derivados de la obtención de datos ficticios (pero que siguen cierta distribución estadística) para saber

si un evento (por ejemplo, aparición de un máximo en el LFP) debe ser considerado como respuesta o como una variación normal de la situación sin estímulo.

Por ejemplo, consideremos la Fig.2.21 que muestra la respuesta neuronal de potencial de campo local (LFP) ante tres situaciones: oscuridad sin estimulación magnética, oscuridad con estimulación magnética y luz azul con estimulación magnética. El asunto es determinar si hay o no respuesta a la estimulación con campo magnético.

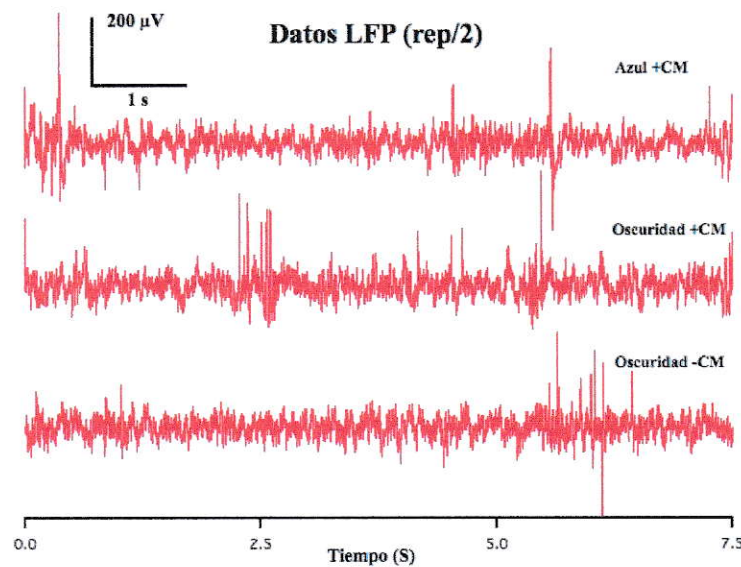


Figura 2.21: Datos LFP de 7.5s de duración

Tres registros de LFP bajo diferentes condiciones: oscuridad (control) sin y con campo magnético y campo magnético con luz azul. La intensidad total del campo magnético aplicado es del orden de 0.2 Gauss, aplicando un estímulo magnético idéntico en cada uno de los registros, tanto para condiciones en oscuridad y luz con campo magnético. La frecuencia de barrido del estímulo magnético es igual a 48 °/s, generando un gráfico de 7.5 s de duración. Estos registros fueron filtrados aplicando una transformada de Fourier, obteniéndose sólo frecuencias entre 0-300 Hz. Este gráfico muestra lo difícil de discriminar si es que existe una variación en una señal cuando el animal es estimulado con campos magnéticos similares al terrestre (en magnitud). Para resolver si existe o no respuesta hay que usar consideraciones estadísticas.

Una primera observación, simple pero crucial, es que la magnitud de la respuesta magnética (si es que existe) es pequeña. La observación cualitativa de cientos de registros muestra que nunca se producen, bajo estimulación magnética, las exuberantes respuestas que se observan siempre en el Tectum bajo estimulación visual de la retina (Fig. 2.20).

Pero el problema es cuantificar la respuesta. Por ejemplo ¿Se deben considerar los eventos (**) de la fig 2.22 como respuestas o sólo deben considerarse como variaciones normales de la situación basal (*)? Es justamente lo similar de estas respuestas lo que hace difícil determinar si hay o no hay respuestas a la estimulación magnética.

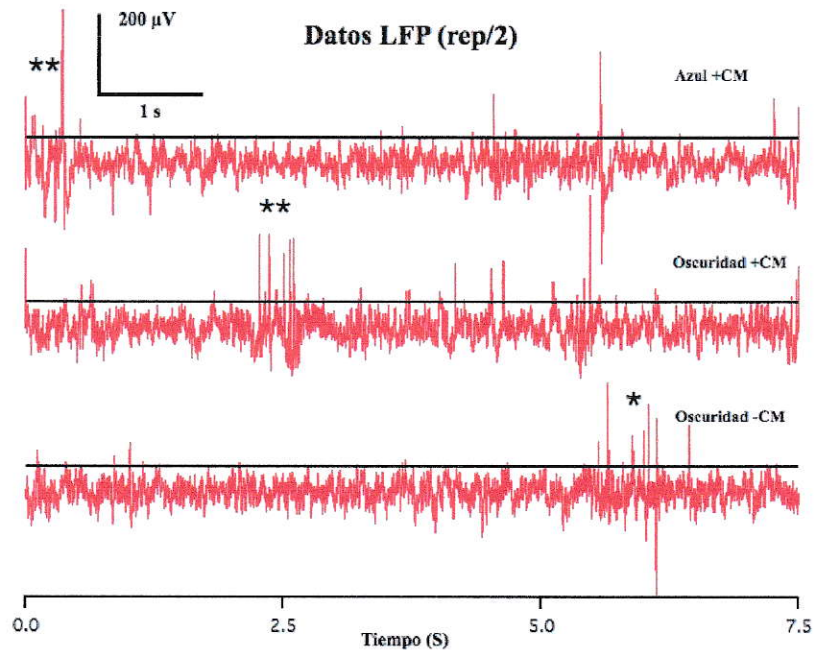


Figura 2.22: Datos LFP con posible estímulo

Tres registros de LFP bajo diferentes condiciones: oscuridad (control) sin y con campo magnético y campo magnético con luz azul. Mismos registros presentados en la Fig.2.21. Observándose un evento bajo estimulación basal (*) y también eventos en Oscuridad +CM y luz Azul +CM (**) que se encontrarían sobre el 99 % del intervalo de confianza (línea negra) del registro basal, pero esto no es suficiente como para asegurar que hay un respuesta magnética, por la variabilidad de los resultados y lo difícil de asociarlos aun estímulo magnético.

En la Fig. 2.22 se aprecia que en oscuridad sin campo magnético artificial (oscuridad -CM), hay una señal (*) en condición de control, lo que nos muestra la generación de actividad neural espontánea en el Tectum óptico sin estimulación. Ahora si observamos los dos registros restantes: oscuridad con un campo magnético artificial (oscuridad +CM) y luz azul con un campo magnético artificial (Azul +CM), vemos que en ambos registros se aprecia una señal (**). Pero estas señales (**) no varían considerablemente de la señal

control (*), haciendo muy difícil determinar si corresponden a una respuesta debido a la estimulación magnética ya que no presentan una correlación visible con el estímulo magnético, por lo que uno tiende a pensar que es solo una respuesta espontánea del TO.

2.4.2. Diferentes maneras de cuantificar respuestas neuronales.

2.4.2.1. Distribución de Amplitud de LFP.

Una manera de cuantificar respuestas neuronales es asumir que la magnitud del LFP es una variable aleatoria y que las características de esta variable aleatoria (promedio, varianza) cambian entre la situación control y el experimento (es decir, bajo estimulación con campo magnético). Por lo tanto un análisis de la función distribución de la amplitud del LFP en la situación control indica con qué probabilidad es posible encontrar la magnitud del LFP en un rango dado. Consideremos por ejemplo la situación basal, es decir en oscuridad y sin campo magnética (Fig.2.21) un histograma de la amplitud de la respuesta (Fig. 2.23) nos dice cual es la probabilidad de tener señales con una amplitud dada.

Con este dato es posible construir la función de distribución que nos dice cual el límite inferior para tener respuestas que sean mayores que el 99 % en amplitud. Por lo tanto, una respuesta se puede considerar como “existente” si tiene una mayor amplitud ($62\mu V$, ver Fig. Fig. 2.23) que este límite de 99 %. Esta manera de cuantificar respuestas esta representada en Fig. 2.24, donde se grafican los límites de 99 % para las mismas señales mostradas en Fig. 2.21.

Desgraciadamente, el análisis de estas situaciones límites (es decir, donde la respuesta es inexistente o muy débil) es engorroso ya que efectivamente existen situaciones donde la señal está más allá del límite establecido por la estadística (ver los eventos marcados con **), pero también existen eventos en la situación basal que tienen amplitudes más allá

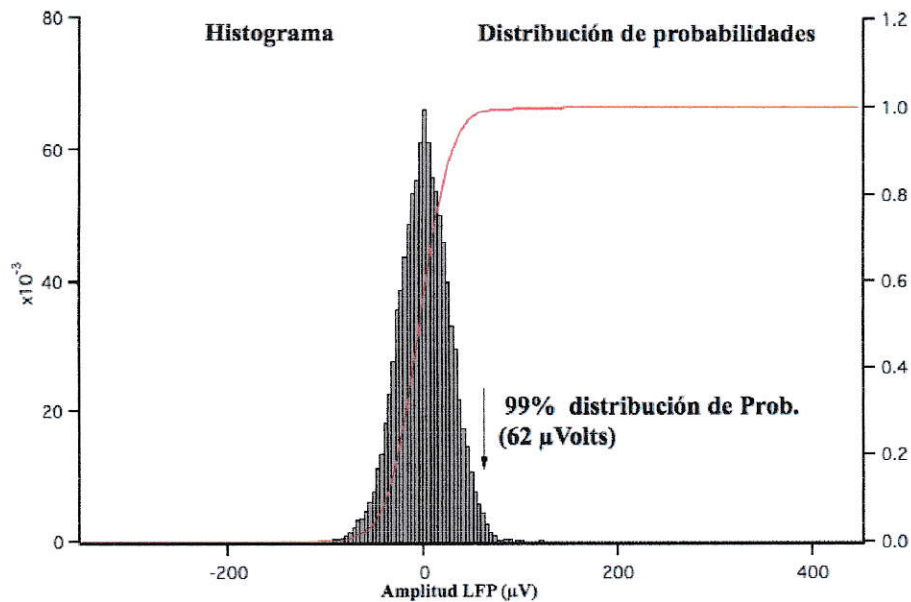


Figura 2.23: Histograma LFP

Se construyó un histograma de un registro en oscuridad y en ausencia de un campo magnético artificial; dicho registro fue un LFP de 7,5 seg de duración. En rojo vemos la integral del histograma normalizada a 1. De la distribución de probabilidades se pudo determinar que el intervalo con 99 % de confianza equivale a un rango de $62\mu V$ en la señal del LFP.

del limite. Este análisis muestra que no es suficiente que la amplitud sobrepase un cierto umbral; para que un evento sea considerado una respuesta a la estimulación magnética, debe tener una duración mínima y una morfología determinada. Considerando el análisis que hemos utilizado, ya que tenemos un intervalo de confianza de 99 %, ocurre que en forma espontánea el 1 % de los puntos de la situación basal pueden estar fuera del rango de aceptabilidad. Con este número debemos determinar si en las situaciones experimentales la cantidad de puntos que sobrepasan ese límite es equivalente al 1 % de los puntos totales (en este caso son 75000 puntos y por lo tanto sólo por azar se debe esperar que 750 de ellos estén mas allá de los límites mostrados por las líneas). Cuando se analizan los datos de la segunda repetición (Tabla 2.1), se observa que bajo todas las condiciones de estímulos hay un número de repuestas que sobrepasan el 1 %. Debemos recordar que en el caso de la condición basal sabemos que dichas respuestas no son provocadas por un estímulo magné-

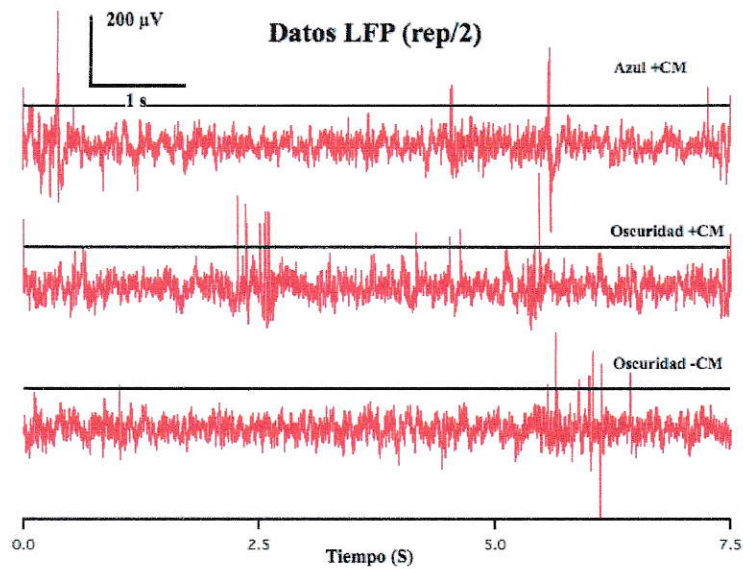


Figura 2.24: Intervalo de 99 % de confianza

La línea en cada uno de los 3 registros delimita el intervalo de confianza de 99 % obtenido a partir del registro realizado en condiciones de oscuridad y sin campo magnético (estado basal). Este caso tiene una amplitud de $62 \mu V$ y es este mismo nivel que se superpone en los registros en oscuridad + campo magnético y en los registros con luz + campo magnético. Observemos que aun sin campo magnético existen niveles de LFP que son de mayor tamaño que el valor límite (línea negra). El asunto entonces es poder discriminar cuando se está frente a una verdadera respuesta o cuando se está frente a una variación esperada de un proceso aleatorio.

tico, ya que el registro es justamente llevado a cabo en ausencia de estímulo, significando que existe una generación espontánea de repuestas. El siguiente problema que surge entonces es discriminar, cuando tenemos respuestas que sobrepasan el 1 %, si corresponden a actividad espontánea o no. Si consideramos que nuestros experimentos se llevan a cabo en un animal vivo, el estado basal del animal pudo haber cambiado por múltiples razones por lo que el número de repuestas generadas espontáneamente puede aumentar; por ende, este criterio no es suficiente como para afirmar si existe o no respuestas provocadas por estímulos magnéticos.

Estímulo	Nº puntos
Oscuridad -CM	933
Oscuridad +CM	2055
Azul +CM	1450

Cuadro 2.1: Respuestas sobre 99 % del intervalo de confianza (2/rep)

La tabla muestra el estímulo magnético aplicado durante 7.5s y cuantos puntos en cada condición de estímulo se encuentran sobre el 99 % de intervalo de confianza. Esta tabla corresponde a la segunda repetición realizada, observándose una alta variabilidad en los datos obtenidos ya que en la condición de oscuridad hay una mayor respuesta que en la condición con luz.

Consideremos ahora los datos obtenidos para la primera repetición, donde se verifica la gran variabilidad de las respuestas ya que en la primera repetición (tabla 2.2) todas las respuestas están bajo el 1 % (menos de 750 puntos) y en la segunda repetición (tabla 2.1) todos las repuestas están sobre el 1 % (sobre 750 puntos).

Estímulo	Nº puntos
Oscuridad -CM	630
Oscuridad +CM	747
Azul +CM	494

Cuadro 2.2: Respuestas sobre 99 % del intervalo de confianza (1/rep)

La tabla muestra el estímulo magnético aplicado durante 7.5 s y cuantos puntos en cada condición de estímulo se encuentran sobre el 99 % de intervalo de confianza. Esta tabla corresponde a la primera repetición realizada observándose, a diferencia de la tabla anterior, que el número de respuestas sobre el 1 % son menores en número o se encuentran dentro de los 750 datos. A pesar de esto, también es posible observar una gran variabilidad obtenida, destacando que el estímulo que presenta el menor número de respuestas por sobre el intervalo de confianza es precisamente al aplicar luz Azul +CM (estímulo que produce repuesta magnéticas según Semm y Demaine).

Ahora consideremos los datos obtenidos en la tercera repetición (tabla 2.3): se observa que la mayoría de las repuestas está bajo el 1 %.

Nuevamente en esta serie de datos no es posible afirmar nada acerca del comportamiento de las respuestas, ya que si se observan los nueve registros en conjunto no es posible encontrar una correlación entre los datos que pueda describirse como reproducible.

Estimulo	Nº puntos
Oscuridad -CM	226
significativo Oscuridad +CM	749
Azul +CM	944

Cuadro 2.3: Respuestas sobre 99 % del intervalo de confianza (3/rep)

La tabla muestra el estímulo magnético aplicado durante 7.5 s y cuantos puntos en cada condición de estímulo se encuentran sobre el 99 % de intervalo de confianza. Esta tabla corresponde a la tercera repetición realizada, observándose sólo en un estímulo un número de respuestas mayor al 1 % (Azul +CM). Este tipo de respuesta se detectó en sólo una de las tres repeticiones, lo que no es suficientemente significativo como para afirmar que en presencia de luz azul + CM hay respuestas al estímulo magnético.

Después de observar los datos obtenidos en una serie de registros completos para un estímulo magnético, podemos decir que no hay ninguna respuesta clara que se detecte en función de estímulos magnéticos, lo que nuevamente nos muestra la gran variabilidad de los datos obtenidos.

2.4.2.2. Las repeticiones

En los argumentos anteriores no se ha considerado las repeticiones de los experimentos. En la Fig.2.25 se observa el mismo patrón de estimulación repetido para otras dos presentaciones de resultados. En estas nuevas repeticiones es posible ver la variabilidad de la respuesta, pero aun no es posible designar una respuesta como positiva, es decir, que más de un 1 % de los puntos estén mas allá del rango definido por la variable aleatoria de la respuesta en oscuridad.

Durante el proceso de obtención de datos se realizaron 3 repeticiones de cada registro aplicando un mismo estímulo magnético. Este procedimiento fue estándar durante el desarrollo de toda la tesis.

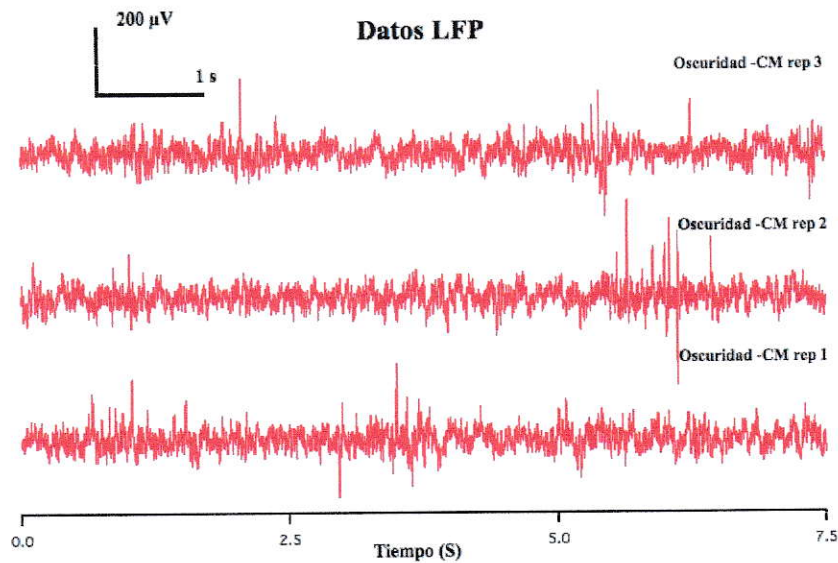


Figura 2.25: Repeticiones de un registro

El gráfico muestra tres repeticiones tomadas en un registro de 7.5 seg, en condición basal (oscuridad sin campo magnético externo). Lo que se aprecia en las repeticiones es que en el registro inferior del gráfico se aprecian respuestas espontáneas de aproximadamente 1 y 3 seg de duración. En el registro del medio sólo se observa actividad espontánea en 5.5 seg. En el registro superior no se aprecia actividad espontánea. Esto ratifica la variabilidad de los registros en oscuridad, lo que se repite también en múltiples condiciones.

2.4.2.3. La envolvente

Un tipo de análisis que se ha usado con bastante frecuencia para evaluar respuestas neuronales es el análisis de la envolvente de las señales. Ejemplos del uso de este tipo de análisis son la electromiografía y el estudio de actividad cortical cerebral.

En nuestro caso, para calcular la envolvente de un registro lo primero que se hizo fue sacar un promedio de las señales LFP para un mismo estímulo magnético. Una vez obtenida la promediación se aplica la transformada de Hilbert, la que nos permite obtener la envolvente de un registro, como se visualiza en la Fig. 2.26. Una vez calculada la envolvente, el procedimiento estándar es calcular el histograma, con el cual podemos determinar el intervalo de confianza de 99 % como se muestra en la Fig.2.23.

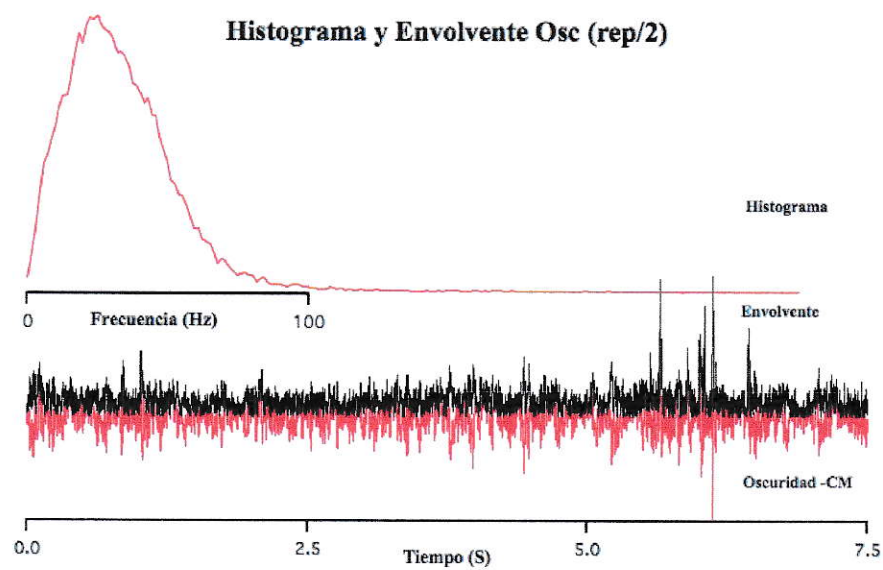


Figura 2.26: Envoltente e Histograma

El registro en rojo representa un LFP en condiciones de oscuridad sin campo magnetico, y superpuesto a este registro observamos en negro la envoltente. En la parte superior del gráfico vemos el histograma calculado a partir de la envoltente.

3

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se agrupan de acuerdo al tipo de protocolo de anestesia usado (Uretano, Ketamina-Xilacina y paloma Despierta) como también al tipo de estimulación foto-magnética aplicada las cuales fueron los siguientes:

- Primer Estímulo (Estimulación uniplanar lenta). Se genera un vector campo magnético artificial de modo que su suma con el vector campo magnético terrestre, generaba un vector campo magnético total cuyo plano de barrido esta contenido en un plano magnético vertical que interceptaba el campo receptivo de las células en estudio ver Fig. 3.1-A, la velocidad de barrido empleada vario desde 3 a 48 °/s. Esta estimulación magnética se acoplaba a varias condiciones de foto-estimulación las cuales eran oscuridad, azul, verde, rojo, y luz blanca, cuya intensidad en Lux fue 5, 77, 130, 73 respectivamente. La ejecución completa de una secuencia de estimulación tomaba varias horas, muchas veces comparamos esta estimulación magnética

con una segunda estimulación magnética similar a la a la recién descrita, donde el plano del segundo estímulo magnético era ortogonal al primero, es decir no se interceptaba el campo receptivo.

- Segundo Estimulo (Estimulación multi-planar lenta). Este tipo de estimulación magnética es similar a la estimulación uniplanar con la única diferencia que se generaron estímulos en múltiples planos verticales. Dichos planos no siempre contenían al campo receptivo de las células estudiada, Fig 3.1-B. Este tipo de estimulación solo se pudo llevar a cabo en algunas ocasiones por el largo tiempo que esto implicaba.
- Tercer Estimulo (Estimulación uniplanar rápida). En este caso se generó una oscilación de la componente vertical del vector campo magnético artificial (32 Hz) de modo que la suma con el vector campo magnético terrestre, generara una oscilación del vector campo magnético total (la oscilación solo se realizó entre $\pm 20^\circ$, dicho ángulo fue medido con respecto al eje Horizontal en el plano vertical) contenida en un plano vertical que interceptaba el campo receptivo de las células en estudio Fig. 3.1-C. La idea era replicar el movimiento producido por las oscilaciones sacádicas.
- Cuarto Estimulo (Estimulación multi-planar horizontal lenta). Este tipo de estimulación magnética es similar a la estimulación multiplanar con la única diferencia que se generaron estímulos magnéticos en el eje vertical (campo visual), ver Fig 3.1-D. Este tipo de estimulación no siempre se pudo llevar a cabo por el largo tiempo que esto implicaba.

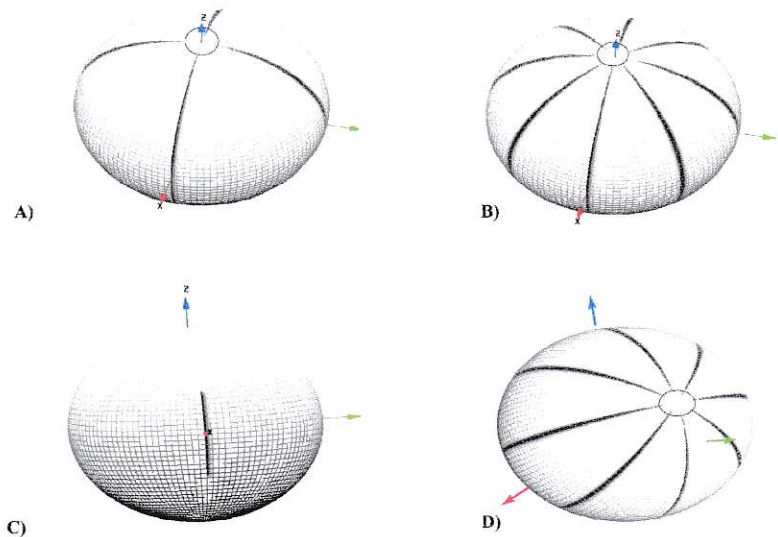


Figura 3.1: Estímulos Magnéticos Artificiales

En este diagrama se presentan los cuatro estímulos magnéticos aplicados durante el desarrollo de esta tesis. Los estímulos A y B tienen la característica común de que estímulo magnético comienza en el eje vertical superior (flecha azul), barre 360° y volviendo a su posición original. El estímulo C solo se aplicó en el campo receptivo visual de la paloma. El estímulo D es similar al estímulo B con la diferencia de que el estímulo comienza en la posición sobre la esfera definida por el experimentador, Esta posición típicamente fue sobre el campo receptivo visual (que se ubicaba en la mayoría de los registros cerca del eje X).

Los registros extracelulares realizados en el TO, se realizaron en tres profundidades (capas) que pueden ser caracterizadas de la siguiente forma:

Superficial $\Rightarrow \sim 300 \mu m$

intermedia $\Rightarrow \sim 550 \mu m$

profunda $\Rightarrow \sim 800 \mu m$

Cada una de las profundidades presenta un registro extracelular característico, asociado al tipo de células neuronales que ahí se encuentren, por ej: en la capas superficiales encontramos actividad asociada a la *paintbrush* esta actividad decrece considerablemente en las capas intermedias y en las capas más profundas del Tectum óptico. Esta actividad

se ve reemplazada por otra población neuronal como son las TGC. Adicionalmente se hicieron registros en el núcleo del tegmento Istmo pars parvocelularis (Ipc).

En todas las situaciones experimentales los experimentos fueron repetidos tres veces, secuencialmente y no al azar.

Posteriormente las respuestas de los distintos registros realizados fueron normalizadas entre 0-1 y se les asigno una escala de 10 colores. De esta forma coloreamos el camino recorrido por el campo magnético sobre una esfera, para poder relacionar la posición relativa del estímulo magnético en el campo visual del ojo derecho de la paloma con sus respuestas en el Tectum óptico Izquierdo. Siendo el color azul de la escala de colores (asignada a la normalización del estímulo) asociado a una respuesta pequeñas y el rojo a una respuesta grandes, de gran amplitud. La evaluación de la magnitud se hizo con los métodos de la sección de métodos.

3.1. Uretano

La palomas anestesiadas con Uretano (N=5) en las cuales solo se utilizó un electrodo de un único canal. Los primeros registros de esta tesis se realizaron aplicando uretano como anestésico. Realizándose registros tanto en el Tectum Derecho como en el Izquierdo. Semm y Demaine [1986] usaron uretano en sus experimentos.

3.1.1. Tectum Óptico Derecho

Para los registros en el TO derecho solo se utilizó una paloma común. El experimento se llevo a cabo variando solo la componente vertical del campo magnético artificial, para lo cual se oriento el estereotaxico de tal forma que el eje antero - posterior de la cabeza

de la paloma, quedara en una posición ortogonal al campo magnético terrestre. Se utilizo esta disposición del estereotaxico porque aun no se contaba con la implementación definitiva del sistema ortogonal de los 3 pares bobinas de Helmholtz (solo se contaba con dos pares de bobinas de Helmholtz, cuya disposición espacial en la sala de registro nos permitía generar un campo magnético artificial en un plano vertical). La dirección del campo magnético artificial generado se dispuso de tal manera que fuera co-planar con el campo magnético terrestre de tal modo que el plano generado entre el campo magnético terrestre y el campo magnético artificial fuera vertical, de esta manera nos fue posible reproducir un campo magnético total (campo magnético artificial + terrestre) similar al utilizado por Semm y Demaine [1986] en su trabajo original. Así mismo se logró que el campo magnético total atravesara el campo visual de la paloma.

La estimulación magnética que se aplico a la paloma consistió en la inversión de la componente vertical del campo magnético artificial (30, 60, 90 seg.) aplicando un campo magnético artificial (aproximadamente 0.2 gauss) y la foto estimulación aplicada fue de luz azul, blanca y en oscuridad.

Con este protocolo de anestesia se realizo un registro extracelular con un electrodo simple en tres profundidades del TO (superficial, intermedio y profundo).

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones fueron negativos en todas las condiciones descritas anteriormente, no se encontró ninguna relación aparente entre las respuestas del TO y la foto-estimulación magnética aplicada.

3.1.2. Tectum Óptico Izquierdo

Para los registros del TO Izquierdo se utilizaron 4 palomas comunes.

- Los dos primeros registros realizados en el TO izquierdo utilizaron la misma configuración experimental que los registros realizados en el TO derecho.
- En las dos palomas restantes se varió considerablemente el sistema de estimulación foto-magnética aplicada. Se utilizaron tres pares de bobinas de Helmholtz formando un sistema ortogonal entre ellas y se utilizó un sistema de foto-estimulación que permitía aplicar luz azul, roja y verde (también se realizaron registros en oscuridad y luz blanca). Es este montaje de estimulación foto-magnética el que se aplicó durante todo el resto de experimentos en esta tesis. La estimulación magnética aplicada a este par de palomas está representado en la Fig.3.1-A, B. En este caso las capas registradas de TO corresponden a las capas superficial e intermedia.

Los resultados obtenidos en esta fase de experimentos fue negativo para las dos palomas registradas en el TO derecho. Para la tercera paloma los resultados obtenidos fueron positivos a estimulación magnética, el estímulo magnético aplicado fue distinto a los estímulos de la Fig.3.1, debido a una falla en la programación. Resultando un estímulo magnético como se ve en la Fig 3.2-A. En la figura se ve una respuesta (posible respuesta) cuando el estímulo magnético pasa por el campo visual del ojo estimulado. Este resultado fue repetido como todos los registros 3 veces para cada condición, pero el resultado favorable solo pudo ser reproducido un par de veces en la misma paloma. Al cambiar la paloma el resultado favorable obtenido anteriormente no pudo ser reproducido, y al corregir la falla en la programación del estímulo magnético (estímulo magnético generado según el proto-

colo Fig.3.1-B) se produjeron respuestas negativa a estímulos magnéticos bajo las mismas condiciones de foto-estimulación y velocidad del estímulo magnético.

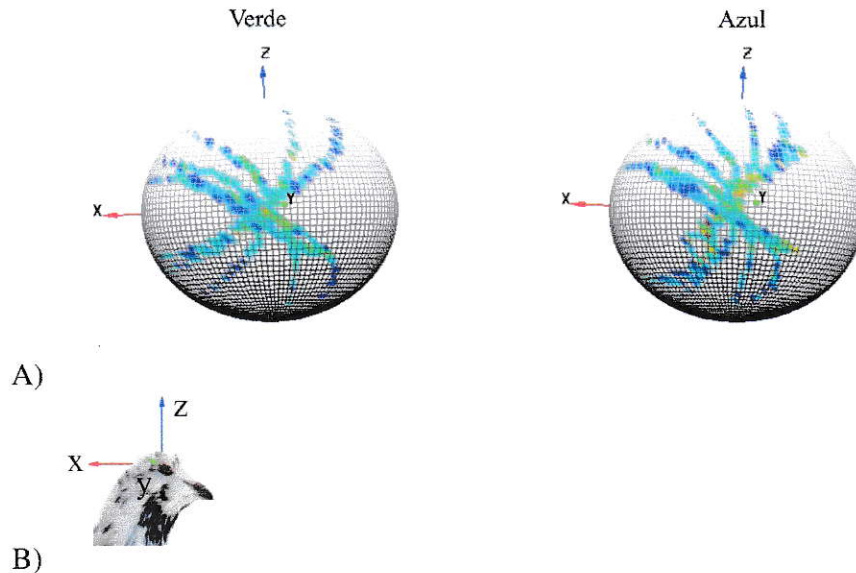


Figura 3.2: Respuestas del TO con estimulación magnética y anestesia (uretano)

A) Muestra la presentación de los resultados obtenidos donde se observa una respuesta positiva a estimulación magnética bajo luz azul y verde, donde también se aprecia que el método de estimulación no coincide con los descritos en la Fig. 3.1, debido a un error de programación. La escala de colores muestra respuestas magnéticas en tonos desde el verde al rojo (mayor concentración en verde) y una escasez de respuestas en color azul. B) Muestra la orientación de los ejes en función de la cabeza de la paloma.

3.2. Ketamina-Xilacina

Las palomas anestesiadas con Ket-Xil fueron 12 en total, todas palomas comunes. A pesar que los experimentos realizados por Semm y Demaine [1986] utilizaban Uretano como anestésico, se decidió cambiar a una mezcla de Ket-Xil (ya que la experiencia colectiva del laboratorio a mostrado que este anestésico presenta mejores condiciones para los registros extracelulares en diferentes núcleos cerebrales). Estos experimentos se llevaron a cabo en el TO izquierdo. Las condiciones de estimulación foto-magnética fueron llevas a

cabo con el montaje del sistema descrito en la sección anterior (Uretano- TO izquierdo), un sistema ortogonal formado por 3 pares de bobinas de Helmholtz (campo magnético artificial en cualquier dirección) y el sistema de foto estimulación de tres colores (azul, verde, rojo).

Se realizaron tres repeticiones del estímulos magnéticos con una velocidad constante que eran 3, 4, 6, 12, 24, 48 °/s para cada una de las distintas longitudes de onda antes mencionadas.

En esta serie de experimentos se utilizaron tres configuraciones de estímulos magnéticos: estimulación uniplanar lenta, estimulación multiplanar lenta y estimulación multiplanar horizontal lenta.

3.2.1. Estimulación uniplanar lenta

Se utilizaron 5 palomas en la estimulación multiplanar lenta, ver Fig. 3.1-A. Realizando tres repeticiones por cada foto-estimulación (azul, verde, rojo y oscuridad) y a tres profundidades distintas superficial, intermedia y profunda. La velocidad de estimulación fueron 6, 12, 24, 48 °/s. Bajo estas condiciones de estimulación no fue posible encontrar ningún tipo de respuesta atribuible a estímulos foto-magnéticos, ver Fig. 3.3.

3.2.2. Estimulación multiplanar lenta

Se utilizaron 10 palomas en la estimulación multiplanar lenta, ver Fig. 3.1-B. Realizando tres repeticiones por cada foto-estimulación (azul, verde, rojo y oscuridad) y a tres profundidades distintas superficial, intermedia y profunda. La velocidad de estimulación fueron 3, 4, 6, 12, 24, 48 °/s, estas velocidades no siempre se realizaron todas en el mismo experimento debido a lo largo del proceso. Bajo estas condiciones de estimulación no fue posible encontrar ningún tipo de respuesta atribuible a estímulos foto-magnéticos.

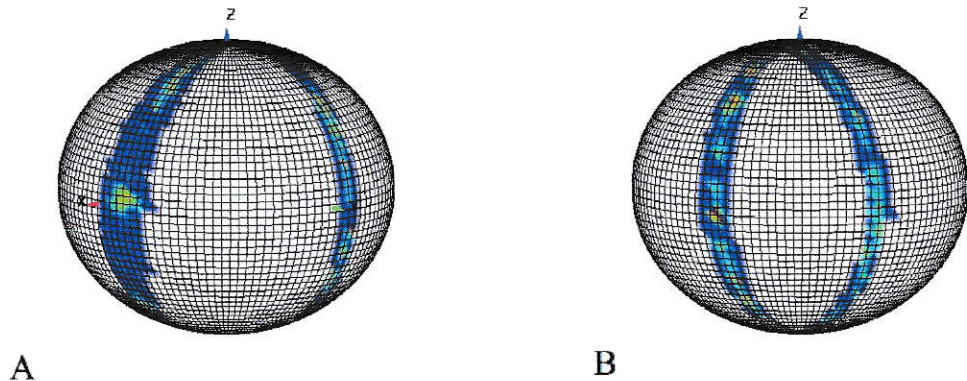


Figura 3.3: Respuestas del TO con estimulación magnética y anestesia (Ket-Xil)

En la figura se aprecia una estimulación uniplanar lenta. En la Fig. A se aprecia el eje positivo X e Y y en la Fig. B el lado opuesto del estímulo de la Fig. A se ve una estimulación en los ejes negativos X e Y. El color azul representa la ausencia de respuestas en el TO y el rojo la presencia de respuestas en el TO. Como se aprecia en la estimulación completa prácticamente no hay respuestas asociadas a estímulos magnéticos y las pocas respuestas que se aprecian se pueden asociar es estimulación basal del TO.

3.2.3. Estimulación multiplanar horizontal lenta

Se utilizaron 2 palomas en la estimulación multiplanar horizontal lenta, ver Fig. 3.1-D. Realizando tres repeticiones por cada foto-estimulación (azul, verde, rojo y oscuridad) y a tres profundidades en el TO: superficial, intermedia y profunda. La velocidad de estimulación fueron 6, 12, 24, 48 %/s. Bajo estas condiciones de estimulación no fue posible encontrar ningún tipo de respuesta atribuible a estímulos foto-magnéticos.

3.3. Palomas despiertas

Las palomas registradas sin anestesia fueron 6 de las cuales 3 eran palomas comunes (en dos palomas se registro el TO izquierdo y en una el Ipc derecho) con un electrodo de un único canal y 3 palomas mensajeras a las cuales se le registro el TO izquierdo utilizando electrodos de un único canal y multicanales.

3.3.1. Palomas comunes

En dos palomas se registro el TO izquierdo y en una el Ipc derecho en ambos casos se estimulo el ojo contralateral. El protocolo de estimulación magnética fue aplicando una estimulación uniplanar lenta y multiplanar lenta (ver Fig. 3.1-A, B), con velocidades de estimulación que fueron: 3, 4, 6, 12, 24, 48 °/s para registros en el TO y 12, 24, 48 °/s para el registro en el Ipc; durante un experimento no es recomendable aplicar todo el rango de velocidades de estimulación por lo extenso que seria el experimento. Esto estresaria a las palomas ya que se encuentran sin anestesiada, durante los múltiples experimentos realizados. Todos estos experimentos fueron realizados con un electrodo de un único canal a tres profundidades distintas en el TO (superficial, intermedio y profunda) en el caso del Ipc solo de pudo registrar a una pura profundidad ya que la paloma se encontraba con un electrodo fijo. La foto-estimulación fue idéntica a la estimulación aplicada a palomas anestesiadas, aplicación de luz azul, verde, rojo y en oscuridad.

Bajo toda esta amplia variedad de condiciones de estimulación foto-magnética y en dos núcleo de la vía tectofugal no se encontró respuestas atribuible a la estimulación aplicada.

3.3.2. Palomas mensajeras

En las 3 palomas mensajeras se registro en el TO izquierdo, pero 2 de ellas fueron registradas con un electrodo de múltiples canales y la otra paloma con un electrodo de un único canal. El protocolo de estimulación magnética fue uniplanar lenta, multiplanar lenta y multiplanar rápida (ver Fig. 3.1-A, B, C). Las velocidades de estimulación fueron: 3, 4, 6, 12, 24, 48 °/s, y durante un mismo experimento no es recomendable aplicar todo el rango de velocidades por lo extenso que seria el experimento y esto estresaria a las palomas. Todos estos experimentos fueron realizados con un electrodo de un único canal

a tres profundidades distintas en el TO (superficial, intermedio y profunda) en el caso del Ipc solo se pudo registrar a una sola profundidad ya que la paloma se encontraba con un electrodo fijo. La foto-estimulación fue idéntica a la estimulación aplicada a palomas anestesiadas, aplicación de luz azul, verde, rojo y en oscuridad.

Bajo toda esta amplia variedad de condiciones de estimulación foto-magnética y en dos núcleo de la vía tectofugal no se encontraron respuestas atribuibles a la estimulación aplicada.

3.4. Resumen de experimentos efectuados

La tabla 3.1 resume todos los experimentos realizados durante esta tesis. Es conveniente subrayar desde ya el significado de la ultima columna (cantidades de respuestas con una posible sensibilidad magnética) en efecto después de registrar 90 unidades en 23 palomas en múltiples condiciones de anestesia y estimulación foto-magnética solo se obtuvo una putativa respuesta magnética. Este resultado contrasta fuertemente con el 70 % de respuesta de sensibilidad magnéticas descritas por Semm y Demaine [1986]. A continuación haremos un desglose de esta tabla condición por condición explicando los distintos protocolos de estimulación y detalles necesarios para llevar a cabo estos experimentos.

A 5 de las palomas comunes se le aplico Uretano como anestésico, haciendo registros extracelulares en ambos hemisferios del TO, utilizando un electrodo simple, de las cinco unidades registradas bajo uretano solo en una se registro una posible sensibilidad magnética (TO Izquierdo). A 12 palomas comunes se les aplico Ket-Xil como anestésico, registrando solo en el TO izquierdo (con electrodo simple) sin encontrar sensibilidad magnética (se registraron 12 unidades). Y bajo una condición sin anestesia, se utilizaron un total de 6 palomas, tres de ellas palomas mensajeras, en esta parte de los experimentos

se utilizaron dos tipos de electrodos un electrodo simple y un electrodo de 16-canales. Los registros con este protocolo fueron realizados en el TO izquierdo (Liedvogel y col. [2007], Wiltshko y col. [2002]) y también se utilizaron 3 palomas comunes registrando en el TO izquierdo y en Ipc derecho (utilizando una paloma común previamente instrumentada para registro crónico del Ipc como parte de otro protocolo experimental del laboratorio), en los registros de palomas sin anestesia se registraron 73 unidades sin encontrar sensibilidad magnética .

RESUMEN

TIPO DE PALOMA	ANESTESIA	LUGAR DE REGISTRO	TIPO DE ELECTRODO	UNIDADES	UNIDADES MAGNETOSENSIBLE
4 NORMAL	URETANO	TECTUM IZQUIERDO	1-CANAL	4	1
1 NORMAL	URETANO	TECTUM DERECHO	1-CANAL	1	0
12 NORMAL	KET/XIL	TECTUM IZQUIERDO	1-CANAL	12	0
2 NORMAL	DESPIERTA	TECTUM IZQUIERDO	1-CANAL	6	0
1 NORMAL	DESPIERTA	IPC DERECHO	1-CANAL	1	0
1 MENSAJERA	DESPIERTA	TECTUM IZQUIERDO	1-CANAL	6	0
2 MENSAJERA	DESPIERTA	TECTUM IZQUIERDO	16-CANALES	60	0
23 PALOMAS	—	—		90	1

Cuadro 3.1: Tabla Resumen

Para el desarrollo de esta tesis se usaron 20 palomas comunes y 3 palomas mensajeras en las cuales se realizaron registros extracelulares de 90 unidades en el TO y el Ipc, las condiciones de registro era anestesiada o consciente. Donde se ve que en solo una de las 90 unidades registradas pareciese que hay una respuesta a estímulos magnéticos. Dicha respuesta puede deberse a la variabilidad estadística (ver Fig. 3.4)

A continuación se presenta un gráfico Fig. 3.4 que nos muestra la variabilidad de los resultados obtenidos en un registro con un electrodo de múlti-canales, lo que nos permitirá tener una idea de cuan variables son los registros extracelulares tomando tres repeticiones en la misma posición y profundidad del TO aplicando una estimulación foto-magnética (luz verde). El gráfico presenta la promediación de la actividad del TO que podemos considerar como respuestas para un solo registro.

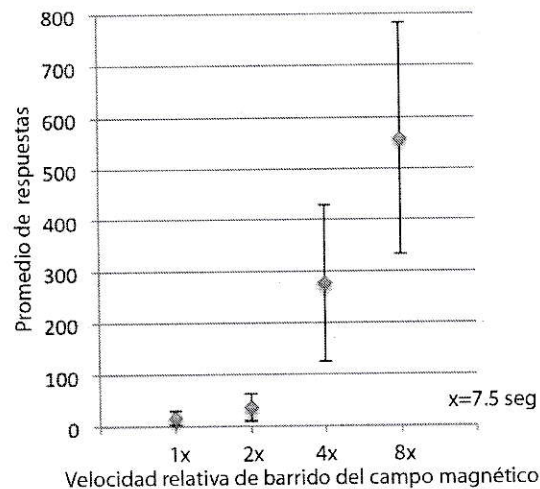


Figura 3.4: Variabilidad de lo Resultados

El gráfico muestra el promedio de actividad neuronal por electrodo y su respectiva desviación estándar bajo estímulo foto-magnético (luz verde). Realizado en el TO izquierdo, en un paloma despierta y con el electrodo de 16 canales con 3 a 5 repeticiones por estímulos, utilizando velocidades de barrido del campo magnético 7.5, 15, 30 y 60 seg. y una estimulación magnética unipolar plana. Observando que para registros de una duración mayor a 7.5 seg. la desviación estándar es aproximadamente del 30 % del promedio y para registros de duración igual a 7.5 seg. la desviación estándar es de aproximadamente 50 % del promedio. En la imagen vemos como aumenta el promedio de actividad en cada electrodo a medida que aumenta el tiempo de registro manteniendo la desviación estándar en un 30 % del promedio aproximadamente

4

DISCUSIÓN

Como se afirmó en la introducción descubrir los mecanismos neurofisiológicos que explican la magnetorecepción en aves es un tema muy importante, ya que se sabe que las aves tienen sensibilidad magnética pero hasta el momento no se conoce cual es el mecanismo de detección, ni su trasfondo neurofisiológico.

En 1986 investigadores (Semm y Demaine [1986]) describieron que un 70 % de las unidades tectales tenían sensibilidad magnética con una razón señal-ruido alta (aprox. 20), y es gracias a este resultado que el trabajo de Semm y Demaine [1986] a sido citado innumerables veces ya sea en el contexto de demostrar que las aves tienen sensibilidad magnética o en forma mas acotada, para sostener que el mecanismo magnético esta basado en el criptocromo.

A continuación se presenta la lista de los 78 trabajos que citan a Semm y Demaine hasta la fecha ordenados alfabéticamente:

Ahmad y col. [2007], Azanza y Del Moral [1994], Beason [2005], Beason y col. [1997],

Bingman y col. [1988], Brasel y col. [2007], Burger y col. [2010], Cain y col. [2005a,b], Deutschlander y col. [1999], Edmonds [1992, 1993, 1996], Finney [1995], Fischer y col. [2001], Gear y col. [2008], Heyers y col. [2010], Johnsen y Lohmann [2005], Jorge y Vicente [2006], Leucht [1990], Liboff y Jenrow [2000], Lohmann y Lohmann [1993], Mai y Semm [1990], McKay y Persinger [2005], Mehlhorn y Rehkemper [2009], Mouritsen y Ritz [2005], Mouritsen y col. [2004], Muheim y col. [2002, 2006], Nemeč y col. [2001, 2005], Olcese y Hurlbut [1989], Olcese y col. [1988a,b], Partch y Sancar [2005], Phillips [1996], Phillips y Borland [1992a,b, 1994], Phillips y Sayeed [1993], Phillips y col. [2010], Picazo y col. [1993], Ritz y col. [2000, 2002], Rowe [1999], Schneider [1995], Semm y Beason [1990a], Stehle y col. [1988], Taube [1998], Thoss y Bartsch [2003], Thoss y col. [2000, 2002], Tian y col. [2007], Vargas y col. [2006], Walcott y col. [1988], Wallraff y Sinsch [1988], Wang y col. [2007], Wiltschko y col. [2008, 2010], Wiltschko y Wiltschko [1995, 2002, 2005, 2006, 2007], Wiltschko y col. [1993, 1994, 2004, 2006], Wu y Dickman [2011], Yano y col. [1996]

Sin embargo, una forma más comoda de visualizar las citas de Semm y Demaine [1986], es ver como varía el número de citas por año (Fig. 4.1).

Como se explicó en la introducción es poco aceptable que un trabajo con tantas implicaciones no haya sido nunca replicado y solo haya sido citado. Es por este motivo que esta tesis es la primera tentativa de replicar tales resultados de manera controlada, usando distintos protocolos de anestesia y variedades de palomas; electrodos de un único y multi canales; distintos protocolos de estimulación magnética, contando además, con mecanismos de control (tales como la medición milisegundo a milisegundo del campo magnético) que no tenía el trabajo original. Por lo tanto esta tesis aumentó el número de variables que pueden controladas con precisión.

A pesar de las múltiples variables que se incorporaron y controlaron en esta tesis, los resultados solo mostraron que aproximadamente un 1% de unidades tectales son sensi-

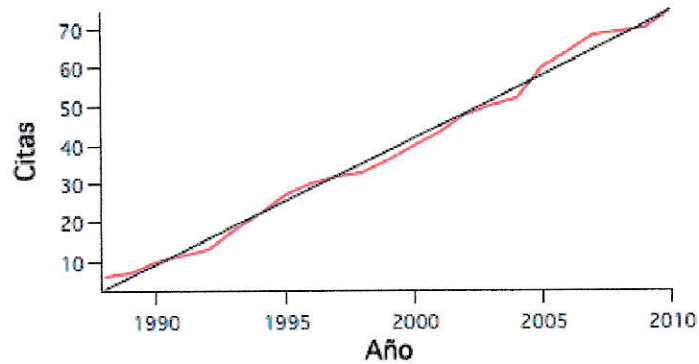


Figura 4.1: Citas a la fecha

En el gráfico se observa como evoluciona el perfil temporal de las citas del paper de Semm y Demaine (Semm y Demaine [1986]) desde 1988 a 2010. Todas las citas son para afirmar que en TO de las aves existen claras respuestas magnéticas. Hay que hacer notar que en el periodo 2000-2010 el promedio de citaciones en neurociencia de trabajos publicados en EEUU, Inglaterra, Alemania, Canadá y Japón fue de 22 citas por trabajo. El trabajo de Semm en ese periodo recibió 37 citas lo cual es notable para un trabajo publicado en 1986. En otras palabras el trabajo de Semm y Demaine es un trabajo muy citado.

bles al campo magnético, resultados que distan bastante del 70 % descrito por Semm y Demaine [1986], este bajísimo porcentaje puede ser explicado por el método estadístico de evaluar respuestas. Nuestros resultados fuerzan a la conclusión que los experimentos originales de Semm y Demaine sufrieron de algún problema en su ejecución.

En efecto, ¿como explicar la discrepancia tan grande entre sus resultados y los aquí expuestos? Esta discrepancia no puede atribuirse al simple protocolo experimental de la anestesia; nosotros usamos una variedad de palomas (comunes y mensajeras), múltiples anestésicos e incluso animales despiertos. Es por este motivo que podemos afirmar que exploramos sistemáticamente el universo de variables asociadas a la anestesia y a la variedad de palomas. Debido a los antecedentes recién mencionados no atribuimos que la diferencia entre ambos estudios se deba a una aplicación incorrecta de los protocolos de anestesia (uretano, ketamina-xilacina y sin anestesia), debido a la vasta experiencia colectiva del laboratorio de biología del conocer en la aplicación de diversos protocolos de anestesia utilizados en el registros extracelulares en palomas.

Respecto a los protocolos de estimulación magnética aplicados en esta tesis, difieren enormemente del único protocolo aplicado por Semm y Demaine [1986] (donde la componente vertical del campo magnético se vario entre -62° y 62° entorno al eje horizontal a velocidades 1- 2 $^\circ/s$), debido a que en esta tesis aplicamos cuatro diferentes protocolos de estimulación magnética (referirse a Cap. resultados Fig. 3.1) con velocidades que variaban entre 3 - 48 $^\circ/s$, midiendo la intensidad, dirección y sentido del vector campo magnético en cada instante.

Una posible explicación para la discrepancia entre nuestros resultados y los de Semm y Demaine se puede deber a la manera en que como Semm y Demaine hicieron sus experimentos. Aparentemente muchas de las respuestas positivas asociadas a campos magnéticos se lograron moviendo un imán de herradura cerca de la cabeza de la paloma, este hecho demuestra que los investigadores no consideraron lo exquisitamente sensibles al movimientos, que son las células tectales y por lo tanto es posible que muchas de las respuestas reportadas fueran falsos positivos debido a estimulación visual. En otras palabras, una posible explicación para la discrepancia entre los resultados es que Semm y Demaine no hayan tomado las debidas precauciones para evitar que su sistema experimental estimulase las células tectales de modo visual y no magnético. Hay que hacer notar que Semm y Demaine eran investigadores del magnetismo y que tienen numerosas publicaciones en este tema, pero no así en el sistema visual de aves, entonces hay un pregunta que debemos hacernos.

¿Porque estos experimentos no han sido repetidos antes? No deja de sorprender que haya pasado un cuarto de siglo sin que estos experimentos fuesen replicados. Creemos que la falta de confirmación de estos experimentos se puede interpretar, como un escaso número de grupos de investigación alrededor del mundo que combinan la experiencia en registros electrofisiológicos tectales y la infraestructura para llevar a cabo los registros bajo campo magnéticos artificiales. Sin embargo, en el Laboratorio de Neurobiología de la

Facultad de Ciencia de la Universidad de Chile, dada la experiencia colectiva en registro en aves, mas nuestra capacidad en el campo de la instrumentación, somos de los pocos grupos calificados para hacer estos experimentos en la actualidad.

En conclusión nuestros resultados sugieren, considerar además de las condiciones de registro de Semm y Demaine, que la existencia de neuronas magneto sensibles en el tectum óptico debe ser re-evaluada.

Carencia de respuesta en Ipc

Particularmente relevante para entender la discrepancia son los resultados negativos al registrar el Ipc en palomas despiertas. El Ipc es un núcleo donde residen mecanismos atencionales encargados de discriminar distintos tipos de estímulos, visuales o auditivos, contenidos en cada instante perceptual (Marín y col. [2005, 2007]).

Por lo tanto, uno hubiese pensado que la magnetorecepción al ser un mecanismo que permite la navegación y orientación de las aves, principalmente en procesos migratorios, debería tener un fuerte carácter atencional, ya que en los proceso de migración la paloma debe ser capaz de discriminar entre múltiples estímulos (visuales y auditivos) que se le presenten.

Respuestas magnéticas en el tectum óptico

A pesar de nuestros esfuerzos por encontrar las exuberantes respuestas descritas en el TO por Semm y Demaine [1986] no nos fue posible encontrarlas. Pero no podemos afirmar aun que TO no es sensible a estímulos magnético. El bajo porcentaje de éxito (1 %)

en encontrar sensibilidad magnética en el TO nos hace suponer que de existir sensibilidad magnética esta debe ser de una amplitud muy pequeña, de modo que solo sean observable bajo riguroso análisis estadístico. Entonces de existir estas respuestas a estímulos magnéticos de baja amplitud en el TO, no significaría una validación de uno u otro modelo de magnetorecepción en aves, debido a que los dos modelos principales de la magnetorecepción proyectan al TO.

Como ya lo hemos mencionado muchas veces durante el desarrollo de esta tesis, existen dos modelos principales de magnetorecepción (la magnetita y el foto-magnético), donde el modelo foto-magnético plantea que las vías de transmisión de las señales magnéticas son a través del nervio óptico el cual se comunica principalmente con el TO y si a esto le agregamos que el TO se caracteriza por procesar señales en su mayoría del sistema visual, se tendería a pensar que el TO se asocia al modelo foto-magnético.

Pero también existe la posibilidad que las señales magnéticas que llegasen al TO lo hicieran mediante una vía indirecta, donde el nervio trigémino proyectaría a los núcleos trigeminales y posteriormente al TO (tal como ocurre en las vías de detección de calor de las serpientes (Berson y Hartline [1988], Newman y col. [1980]). Para hacer todo más complicado, dado que el tectum óptico recibe un importante input del "wulst" (un input telencefálico, vía tálamo-fugal) podría pasar que la sensibilidad magnética dependiese del criptocromo pero viajase por la vía retino talámica hasta el wulst y desde ahí descendiese hasta el tectum. Pero todas estas interesantes elucubraciones anatómo-fisiológicas son vacías mientras no se pueda registrar *sistemáticamente* las respuestas magnéticas en el cerebro de la paloma.

No hay que olvidar que alrededor del año 1986 cuando, se publicó el paper que motivó esta tesis, los mismos científicos mostraron respuestas magnéticas en el sistema trigeminal de la palomas y el Charlatán (*Dolichonyx oryzivorus*), trabajos que tampoco han sido replicados, debido a lo complicado de su realización pese a que no se requiere una increíble

tecnología para realizarlos. Anteriormente habían realizado registros el núcleo vestibular (Semm y col. [1984]) de palomas, donde encontraron unidades magnetosensibles, sensibilidad que dependía de la inclinación de la paloma. Este último resultado apunta a una posible interacción entre la magneto-recepción y la actividad de los canales semicirculares. Por lo que sería importante no solo re-explorar los experimentos del ganglio trigémino sino también los del núcleo vestibular.

Estimulación de luz

La estimulación lumínica es un factor importante en la magnetorecepción en aves, ya que uno de los dos modelos principales de la magnetorecepción depende de fotostimulación (foto-magnético) para la detección de campos magnéticos terrestres. Es por este motivo que la intensidad de luz aplicada durante los experimentos de esta tesis deben estar claramente caracterizados.

Los protocolos de foto-estimulación fueron determinados gracias a dos tipos de experimentos:

- Experimentos conductuales de biomagnetismo con foto estimulación en aves (con una conducta altamente migratoria), donde se establecieron cuales serían las longitudes de ondas en los cuales se produciría orientación y desorientación bajo estimulación magnética.

- Experimentos en criptocromos, generando una reacción par-radical para la detección de campos magnéticos. Estos experimentos fueron llevados a cabo en plantas (*Arabidopsis thaliana*) en las cuales se experimento con criptocromos-1 bajo luz azul-verde y bajo presencia de campo magnéticos terrestre (Solov'yov y col. [2007]).

Mediante estos experimentos se estableció que las longitudes de onda optimas para la detección del campo magnético serian un color entre azul y el verde, y con el color rojo se produciría una inhibición de la detección del campo magnético. A pesar de toda la información que se tiene, aun no esta claro cuales debería ser el protocolos de estimulación lumínica (intensidad lumínica aplicada) en este tipos de experimentos.

En esta tesis la intensidad de la luz aplicada durante la estimulación magnética se mantuvo constante para cada longitud de onda usada. Para lo cual se utilizaron ampollitas de LED de distintas longitudes de ondas (rojo, verde y azul). Entonces por los antecedentes recién mencionados, la intensidad lumínica jugaría un rol importante en la magnetorecepción en aves, por lo que debería ser una variable a considerar en futuros experimentos.

Nuevos Antecedentes

Al finalizar esta tesis, se descubrió una tesis de magíster del 2005 de la universidad de Otago, Nueva Zelandia (Rose [2005]), en la que se trata el tema de la magneto-recepción en aves, haciendo registros extracelulares en el hipocampo y entopalio de palomas, núcleos que se asocian a la capacidad migratoria y al procesamiento de señales del sistema visual respectivamente.

El hipocampo

Es un núcleo que históricamente relacionado con la capacidad migratoria de las aves, mas específicamente con la capacidad de la ubicación espacial de las aves; orientarse en las noches despejadas con la ubicación de las estrellas o en el día con la posición del sol y la capacidad de definir marcas (ej. edificios que se mantienen invariable en un corto tiempo) para migraciones cortas o largas (Gagliardo y col. [1999]). Siendo está, posible-

mente la razón para investigar si el hipocampo esta relacionado con el fenomeno de la magnetorecepción (Rose [2005]).

El entopallio

Es un núcleo que es parte del la vía tecto-fugal (partiendo en la retina ->tectum óptico ->rotundo ->entopallio; ver Fig.4.2). Un estudio en este núcleo tiene una directa relación con el modelo de magnetorecepción par-radical, ya que en forma indirecta recibe información de las vías visuales. Rose en su tesis también menciona ampliamente que los únicos registros extracelulares realizados en palomas fueron realizados por Semm y Demaine [1986].

El desarrollo de la tesis de Rose también se lleva acabo bajo estimulación foto-magnética, utilizando un sistema tria-axial de bobinas de Helmholtz (con una distribución idéntica a las construidas para esta tesis, pero mas pequeñas) lo que le permitía generar un campo magnético artificial en cualquier dirección. El campo magnético generado fue mayor al utilizado en esta tesis (0.2 gauss) y en el trabajo de Semm y Demaine (0.4 gauss), esto debido a que Nueva Zelanda esta cerca del polo norte magnético, donde el campo magnético terrestre es de 0.6 gauss, lo que significa que cada uno de estos tres experimentos se llevaron acabo considerando las características del campo magnético terrestre en los distintos lugares geográficos, junto con el sistema de estimulación magnética se implementó un sistema de foto-estimulación utilizando un sistema simple de iluminación, pero con menos variable que en esta tesis (oscuridad y luz verde, azul, rojo y blanco) Rose en su trabajo utilizó luz blanca y luz verde para la realización de sus experimentos (la intensidad de la luz se mantuvo contente durante todo su experimento).

Los registros realizados por Rose [2005], los realizó con palomas despiertas (N= 33) y registrando aproximadamente 120 unidades entre el hipocampo y el entopallio (ambos he-

misferios). Siendo su principal resultado, no encontrar actividad neuronal como respuestas a estímulos foto-magnéticos.

Como conclusión de sus resultados Rose [2005], al no encontrar respuesta magnética en el entopallio e hipocampo de las palomas y considerando la literatura existente hasta la fecha sobre registros extracelulares, asociados a estimulación magnética en aves, donde solo Semm y Demaine [1986] han tenido éxito en este tipo de registro, Rose considera que la magneto-recepción podría no es un fenómeno real, dudando de los resultados obtenidos por Semm y Demaine [1986] y poniendo en duda que las palomas tengan capacidad de magnetorecepción.

Los resultados obtenidos por Rose son de gran importancia para esta tesis, ya que nos ayuda a reafirmar los resultados obtenidos hasta ahora, donde los núcleos de la vía tectofugal (tectum óptico e Ipc) no presentan respuestas significativas que apoyen los resultados de Semm y Demaine [1986] de igual forma que los registros realizados en el entopallio (núcleo de la vía tectofugal), lo cual podría servir para reenfocar la viabilidad de las distintas vías por las cuales se podrían transmitir las señales magnéticas en el modelo par-radical (vía talamofugal).

Lagena

Recientemente se publicó un artículo (Wu y Dickman [2011]) que plantea a la Lagena como una tercera vía para las transmisiones de las señales magnéticas en las aves. La Lagena es una estructura del oído medio de aves y reptiles la cual cuenta con una estructura que podría ser capaz de detectar campos magnéticos por medio de cristales de magnetita (posiblemente con un mecanismo similar al descrito por el modelo de magnetorecepción de la magnetita). Los experimentos llevados a cabo en la Lagena se realizaron usando un marcador de actividad neuronal llamado c-Fos, para lo cual ubicaron a las palomas en me-

dio de campo magnético entre 1-3 veces el campo magnético terrestre por un par de horas. Mediante el c-Fos se detectó actividad neuronal en los núcleo vestibular, hipocampo, tálamo dorsal e hiperpallium y posteriormente se repitió el experimento lesionando la lagena encontrando que no hubo marcación neuronal en los cuatro núcleos recién mencionados. Es por estos resultados que considera los núcleos asociados al lagena como una tercera vía para de detección de campos magnéticos en aves (ver Fig. 4.3).

Direcciones futura

Obviamente en ciencia es muy difícil probar que algo no existe, nuestros resultados no indican la inexistencia absoluta de respuestas magnéticas en el tectum de las aves, lo que indica los resultados de esta tesis es que la sensibilidad magnética en el TO descrita por Semm y Demaine (70 % de las unidades son sensibles a campos magnéticos con una razón señal-ruido de al menos 20) no pudieron ser replicada en esta tesis, encontrando que un 1 % de unidades son sensibles a campos magnéticos, mediante métodos estadísticos. Lo que nos hace pensar que de existir una sensibilidad magnética, esta debe encontrarse en propiedades mas sutiles de las respuestas neuronales como una capacidad poblacional o distribuida de un grupo neuronal, por ejemplo en la corteza motora del mono es posible deducir la dirección de los movimientos del brazo si se registran grupos neuronales ($N > 30$), pero esa deducción es imposible de hacer registrando una sola neurona (Georgopoulos y col. [1988]), pudiese ser que algo similar estuviese ocurriendo en el Tectum pero nuestros experimentos con múltiples electrodos muestran que al menos con 12 sitios de registros simultáneos no es posible detectar correlaciones relacionadas con el campo magnético, tal vez las correlaciones magnéticas son mas sutiles aún, lo que podría significar que se deba buscar en otros núcleos asociados al sistema visual.

Puede ser que el sitio donde se deba buscar la respuesta magnética sea el núcleo rotun-

do donde se produce una enorme convergencia de señales tectales de acuerdo a la neurotopía llamada *field to locus* descritas por Marín y col. [2007]. Por lo tanto se sugiere que los próximos experimentos para encontrar respuestas magnéticas en aves sean registros con múltiples electrodos en el núcleo rotundos y en el wults (Mouritsen y col. [2004]) donde se ha encontrado sensibilidad magnética utilizando marcadores de actividad neuronal (ZENK).

Respuestas en el Rotundo

Si efectivamente experimentos exhaustivos son realizados en el rotundo con múltiples electrodos, no revelaran respuestas magnéticas, uno se vería forzado a concluir que la vía retino tectal de aves no está involucrada en la magneto-recepción. Siendo esta la primera hipótesis sobre el rotundo (ausencia de sensibilidad magnética) que uno podría hacer considerando el trabajo Rose [2005], que registró el entopallio (sin encontrar sensibilidad magnética) núcleo donde proyecta el rotundo, esta hipótesis gana mas fuerza si consideramos los resultados de esta tesis donde no se encontró sensibilidad magnética en el TO, ya que es el TO el núcleo que proyecta al rotundo, por lo tanto es difícil creer que en un núcleo intermedio (rotundo) pueda existir respuestas magnéticas.

Respuestas en el Wults

Es aún posible considerar que la sensibilidad magnética dependa de la vía retino talámica, como ha sido recientemente mostrado en forma indirecta usando el marcador de actividad neuronal ZENK, Mouritsen y col. [2004] encontraron que el wults visual (núcleo de la vía retino talámica) presenta actividad positiva para ZENK después de estimular magnéticamente a un European Warbler (*Luscinia megarhynchos*). Este es un resultado bastante interesante ya que el wults es un núcleo de fácil acceso para realizar registros extracelulares.

Desgraciadamente las palomas no parecen ser el sistema mas adecuado para hacer estos experimentos, ya que los experimentos neuroanatómicos recientes usan al European Warbler; este es un pájaro con una fuerte conducta migratoria en los cuales se ha podido demostrar indudablemente un comportamiento asociado al campo magnético (Wiltschko y col. [2008]). Hacemos notar que aun hoy, y a pesar de un paper publicado en *Nature* (Mora y col. [2004]), no se ha podido demostrar conductualmente que las palomas puedan ser condicionadas por campos magnéticos.

No obstante, la situación que gatilló esta tesis, fue que la descripción de hace un cuarto de siglo sobre la magnetorecepción es considerada por muchos científicos del biomagnetismo en aves como valida, sin que se halla replicado. Insistimos que encontrar respuestas magnéticas robustas y reproducibles en el tectum abriría un fascinante campo de estudio sobre integración sensorial y de no ser así seria una pena que estas repuestas no existan o sean tan difíciles de encontrar.

A continuación se presentan una serie de figuras en los que se ven representado los resultados mas significativos sobre registros de magneto-recepción realizados en los distintos núcleos del cerebro de las aves. Estos registros engloban tanto al modelo de la magnetita como al par-radical.

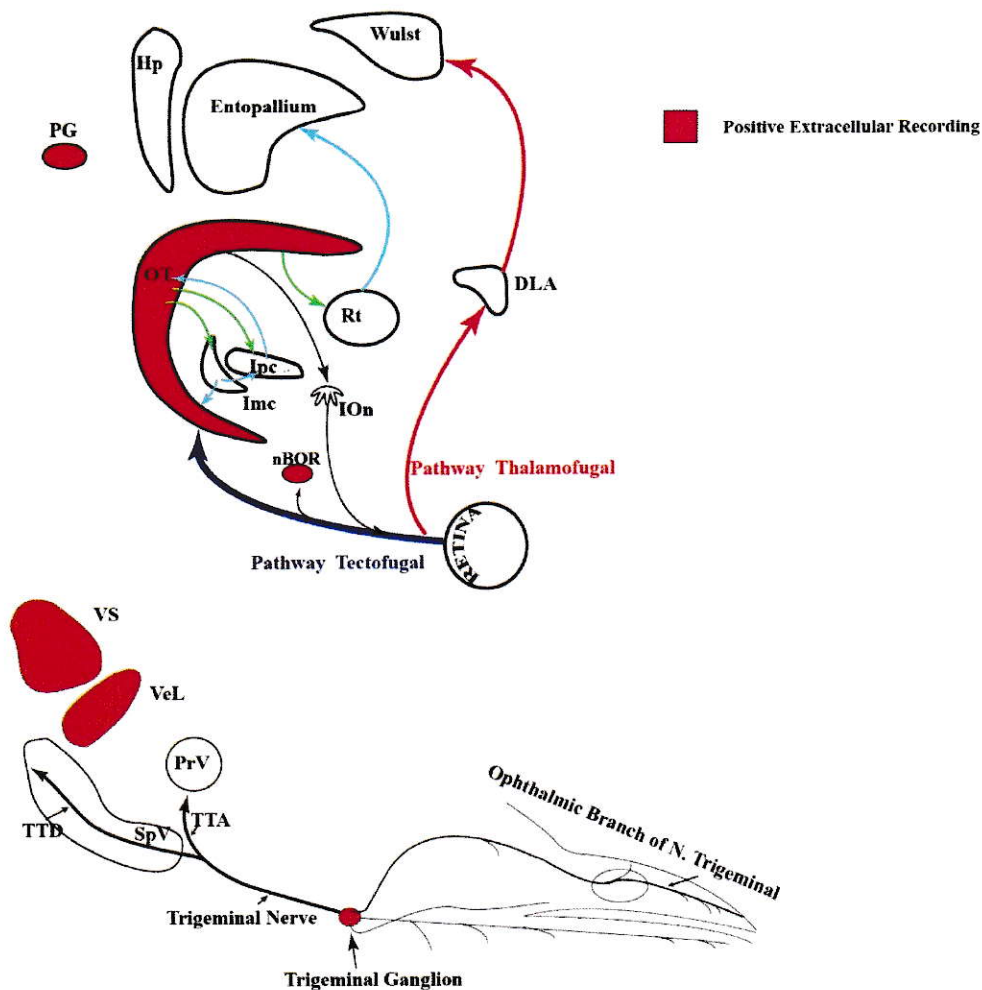


Figura 4.2: Registros positivos de actividad magnética en el cerebro de las palomas

El diagrama muestra los lugares donde se han realizados registros extracelulares en busca de respuestas magnéticas en aves.

En el modelo de la magnetita se plantea que la señal magnética es transmitida a través del nervio trigémino. Aquí se muestran en rojo, el ganglio trigémino donde se encontró repuestas debido a estímulos magnéticos (Semm y Beason [1990b]), siendo el PrV el núcleo sensorial principal del nervio trigémino, el SpV el núcleo trigeminal espinal del nervio trigémino, el TTD el tracto descendente del ganglio trigémino y el TTA el tracto ascendente del ganglio trigémino.

En el modelo par-radical tenemos la vía tecto-fugal donde encontramos el tectum óptico (OT) y el nBOR también se encontraron respuestas magnéticas (Semm y Demaine [1986]). Siendo el Istmo parvo celular (Ipc) y el Hipocampo (Hp). También se registro el VS el núcleo vestibular superior y el VeL el núcleo vestibular lateral, encontrando respuesta a estímulos magnéticos en cada uno de los núcleos (Semm y col. [1984]). Hay que notar que todos los registros positivos fueron hechos por el mismo grupo.

En la Fig. 4.2 se presentan los registros extracelulares positivos de actividad magnética realizados en aves desde 1986 hasta la fecha. Los registros son hechos en áreas asociadas tanto al modelo foto-magnético (par radical) y al modelo de la magnetita. Destacando que *todos* estos registros extracelulares fueron realizados antes de 1990 por el mismo grupo.

La característica principal que se aprecia en este diagrama, son los dos modelos principales de la magnetorecepción como viables, mostrando sensibilidad magnética en el nervio trigémino (modelo magnetita) y también mostrando sensibilidad magnética asociada al tectum óptico y nBOR (modelo foto-magnético).

En la parte superior del diagrama vemos un esquema asociado al modelo foto-magnético, donde se muestra la vía tectofugal como la vía de transmisión de las señales magnéticas. En la vía tectofugal se encuentra el TO (principal núcleo visual donde llega el 95 % del nervio óptico), el cual se comunica con núcleos como el Ipc (donde residen mecanismo atencionales, los que pueden ser asociados a procesos migratorios) y el rotundo, lo que nos hace pensar que los núcleos de la vía tectofugal podrían ser un buen candidato procesamiento de las señales magnéticas. Con respecto al modelo de la magnética, esquema inferior del diagrama, vemos que en el ganglio trigémino se han detectado señales magnéticas, lo que nos muestra al nervio trigémino también es una vía viable de transmisión de las señales magnéticas (asociado al modelo magnetita). Por lo que podemos concluir a partir de los primeros registros extracelulares asociados a la magnetorecepción en aves, que ambos modelos son factible para explicar magnetorecepción en aves (modelo foto-magnético y modelo de la magnetita).

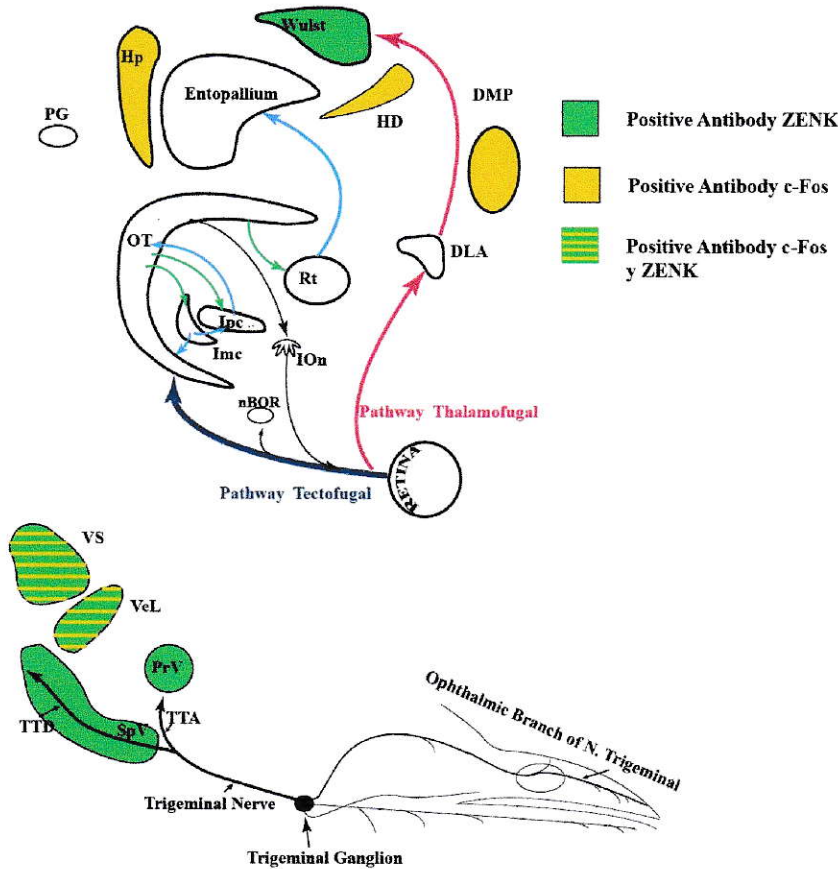


Figura 4.3: Marcador positivos de actividad magnética en el cerebro de las palomas

El diagrama muestra los lugares donde se han realizados experimentos en busca de respuestas magnéticas en aves, con mediciones indirectas, usando marcadores de actividad neuronal.

Aquí se muestran los núcleos marcados con el anticuerpo Zenk (verde) que reaccionan frente a la activación neuronal (en este caso bajo estimulación magnética), los núcleos activados son el PrV el núcleo sensorial principal del núcleo trigémino y el SpV el núcleo trigeminal espinal del núcleo trigémino, el TTD el tracto descendente del ganglio trigémino y el TTA el tracto ascendente del ganglio trigémino (Heyers y col. [2010]). En la vía talámofugal se observó activación neuronal en el wulst.

En amarillo tenemos los núcleos marcados con c-Fos siendo (Hp) hipocampo, (HD) hiperpalium densocelular, (DMP) núcleo talámico dorsomedial posterior y (Vs)-(VeL) los núcleos vestibulares (Wu y Dickman [2011]).

En la Fig.4.3 se presentan los resultados positivos para sensibilidad magnética en aves, utilizando un método alternativo al registro extracelular, el cual consiste en utilizar marcadores de actividad neuronal ZENK y c-Fos . Este método consiste en estimular (magnéticamente) al ave por varias horas, de modo que las neuronas sensibles a estimulación magnética se exciten (la mayoría de las neurona excitada libera ZENK y c-Fos independiente del estímulo aplicado) y posteriormente mediante métodos histoquímicos se determina la ubicación de la población neuronal que liberó el marcador (por estimulación magnética) en el cerebro del animal. Esta técnica mostró que en el wulvs había sensibilidad a estímulos magnético (utilizando ZENK). Siendo el wulvs un núcleo que forma parte de la vía talamofugal, contradiciendo los resultados de Semm y Demaine [1986], que mostraban a la vía tectofugal como candidato para las vías de transmisión de las señales magnéticas (TO) asociadas al modelo foto-magnético. Por otro lado también se encontró actividad neuronal con el marcador ZENK en núcleos asociados al nervio trigémino (modelo de la magnetita) como el núcleo sensorial principal del nervio trigémino y el núcleo trigeminal espinal del nervio trigémino ambos sensibles a estimulación magnética. Con el marcador c-Fos se marcaron los núcleos vestibulares, núcleos talámicos, el hipocampo y el hiperpalium, núcleos que plantean un posible tercera vía de transmisión de las señales magnéticas.

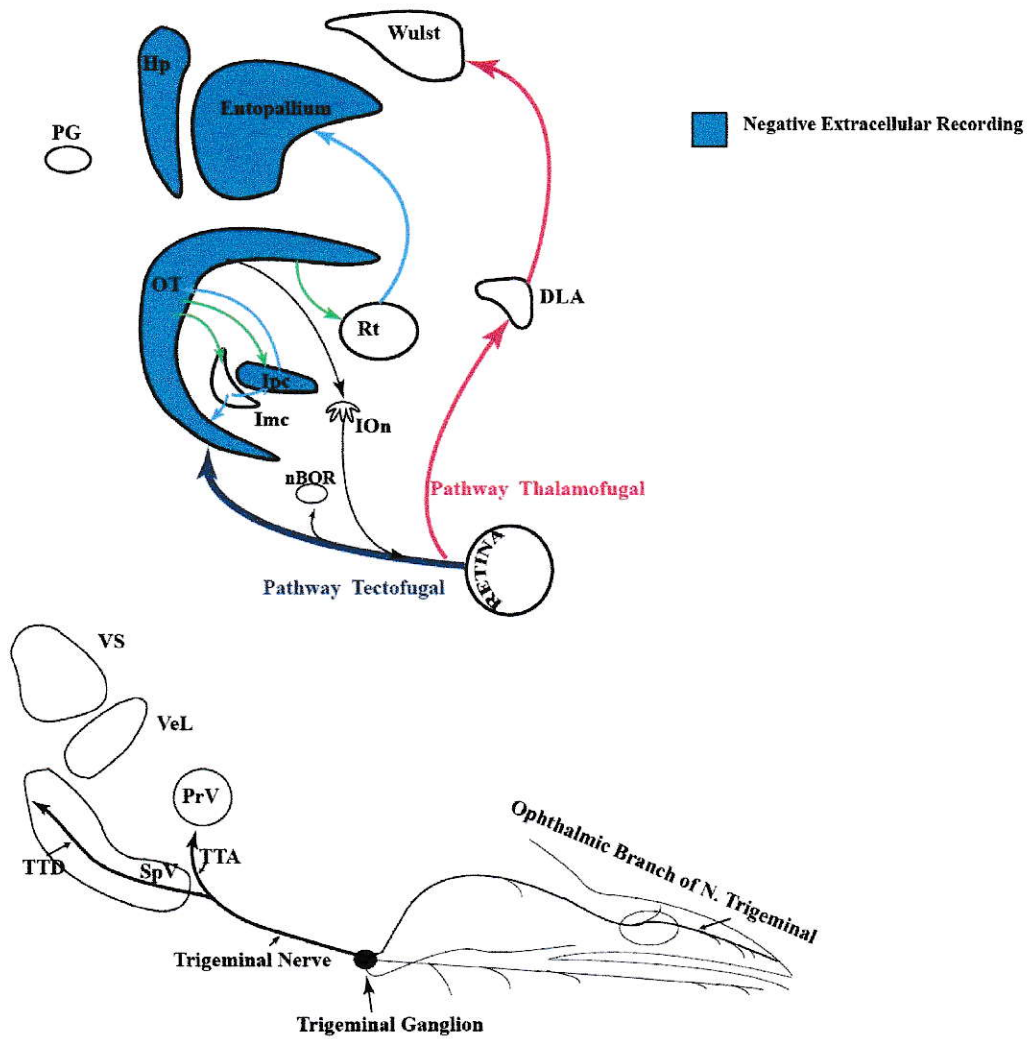


Figura 4.4: Registros negativo de actividad magnética en el cerebro de las palomas

El diagrama muestra los lugares donde se han realizados registros extracelulares y no se han encontrado respuestas magnéticas en aves. Los núcleos registrados pertenecen a la vía tectofugal, siendo TO y Ipc los núcleos registrados en esta tesis y el hipocampo y entopallio los núcleos registrados en la tesis Rose. No se encontró respuestas magnéticas en ninguno de estos núcleos.

En la Fig. 4.4 se muestran los resultados de registros extracelulares negativos para sensibilidad magnética en aves, como podemos ver los experimentos se centraron en núcleos visuales de la vía tectofugal. En esta tesis se realizaron registros en el TO y el Ipc y en el trabajo de Rose [2005] se realizaron registros en el entopallio e hipocampo. con estos resultados uno puede darse cuenta que tres de los cuatro núcleos registrados forman parte de la vía tectofugal, quedando fuera de la vía los núcleos istmicos (Imc, Slu y IOn) y el rotundo. Siendo el rotundo un núcleo interesante de registrar ya que en él convergen gran cantidad de señales tectales, pero por la información representada en este diagrama podríamos pensar que en el rotundo no debería tener sensibilidad magnética ya que es un núcleo que se encuentra entre el TO y el entopallio, ambos sin sensibilidad magnética (según los últimos experimentos realizados). Pero a pesar de esto no es posible descartar por completo la posibilidad de que si exista sensibilidad magnética en el rotundo, ya que la población neuronal que proyecta a este núcleo (TGC neuronas de gran tamaño que realizan una amplia integración neuronal en el TO) no es la misma que proyecta al Ipc o que se registra en las capas superiores del TO (paintbrush). Es por esto que es necesario realizar un registro en el rotundo ya que sin evidencia experimental no se puede asumir ninguna de las dos posibilidades, de no haber señal aquí ratificaría la idea que se concretó en esta tesis que los núcleos de la vía tectofugal no son los encargados del procesamiento de las señales magnéticas en las aves (modelo foto-magnético), resultado que en cierto modo se ve apoyado indirectamente por el método de marcador neuronal ZENK el cual muestra como vía de transmisión de las señales magnéticas la vía talamofugal.

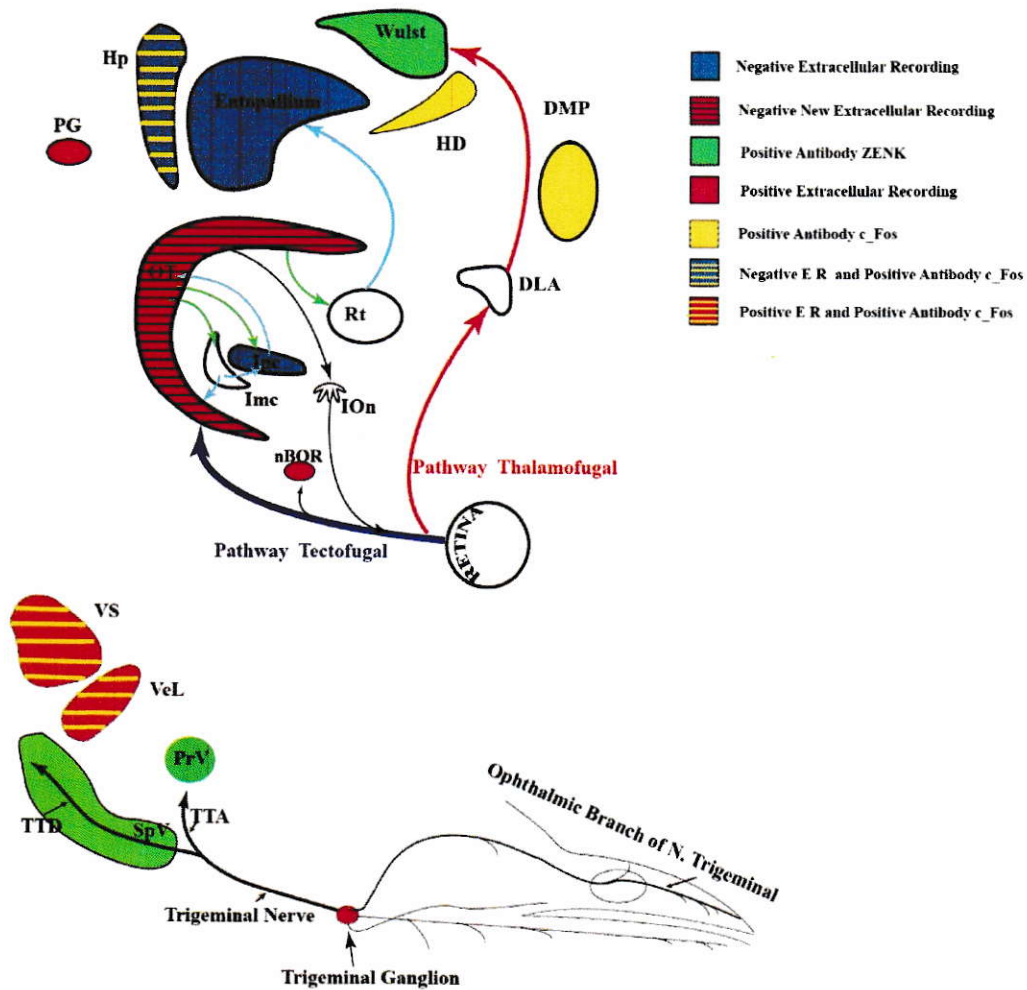


Figura 4.5: Resumen de la actividad magnética en el cerebro de las palomas

El diagrama muestra todos los lugares donde se han realizados registros en busca de respuestas magnéticas en aves, en forma directa e indirecta (usando marcadores de actividad neuronal).

Se pueden apreciar los registros extracelulares donde se registraron respuestas magnéticas en rojo, en verde la actividad mediante la utilización de ZENK y amarillo mediante la utilización de c-Fos. En azul encontramos los registros extracelulares donde no se encontró respuesta a la actividad magnética.

Hay que notar que el TO y el Hipocampo presentan un conflicto, ya que (Semm y Demaine [1986]) registraron respuestas magnéticas en el TO, pero en esta tesis no se registraron respuestas magnéticas en el TO (rojo con rayas negras), y el hipocampo tampoco registró respuestas a actividad magnética (Rose [2005]) resultados que se contraponen a los encontrados con c-Fos (Wu y Dickman [2011]), y tampoco se registraron respuestas magnéticas en los núcleos que pertenecen a la vía tectofugal (Ipc y entopallio).

En verde vemos los núcleos donde se aplicó el anticuerpo ZENK se encontró respuesta a actividad neuronal, el PrV el núcleo sensorial principal del nervio trigémino, el SpV el núcleo trigeminal espinal del nervio trigémino y en el wulst (Heyers y col. [2010]) y en amarillo vemos las respuestas con c-Fos en el (Hp) hipocampo, (HD) hiperpallium densocellular, (DMP) núcleo talámico dorsomedial posterior y (Vs)-(VeL) los núcleos vestibulares. Semm y Demaine también registraron los núcleos vestibulares (en rojo), registrando respuestas magnéticas, en el VS el núcleo vestibular superior, el VeL el núcleo vestibular lateral y el ganglio trigémino. Siendo el TTD el tracto descendente del ganglio trigémino, el TTA el tracto ascendente del ganglio trigémino.

En la Fig. 4.5 se presenta el ultimo diagrama donde vemos un resumen de la sensibilidad magnética en el cerebro de las aves (palomas principalmente), donde se aprecian los núcleos que han dado positivos a sensibilidad magnética (registro extracelular, ZENK y c-Fos), núcleos que han dado negativo (registro extracelular) y núcleos que podrían definirse como en conflicto (Semm y Demaine [1986] dio positivo TO y esta tesis dio negativo los registros extracelulares en el TO e Ipc). En la parte superior del diagrama vemos el esquema asociado al modelo foto-magnético, donde se ven las dos posibilidades de transmisión de las señales magnéticas vía tectofugal que en un comienzo se consideraba que los núcleos que se encuentran en esta vía eran el centro de procesamiento e las señales magnéticas, esta idea empezó a cambiar cuando no fue posible reproducir dichos resultados (sensibilidad magnética en el TO principalmente) y si consideramos que al realizar experimentos con marcadores de actividad neuronal ZENK el mostró como posible centro de procesamiento de la señales magnéticas al núcleo wulvs el cual la cual pertenece a la vía talamofugal. Estos resultados plantean un camino claro a seguir el cual seria registrar el rotundo para descartar la vía tectofugal y registrar también los núcleos de la vía talamofugal como son el DLA y el wulvs núcleos que no han sido registrados extracelularmente bajo estímulos foto-magnéticos. También hay que considerar la nuevas posibilidades que plantean los experimentos con c-Fos los que han encontrados nuevos núcleos sensible a estímulos magnéticos.

Por otra parte los registros extracelulares asociados al modelo de la magnetita son mas consistente entre los distintos métodos aplicados ya que en ambos se presenta sensibilidad magnética en el nervio trigémino y núcleos donde este nervio proyecta, aunque esto no es suficiente para validar 100 % el modelo de la magnetita ya que es necesario registrar sistemáticamente desde los núcleos a los que proyecta el nervio trigémino, registros que aun no se han realizado.

Conclusión Final

Esta tesis corresponde a uno de los dos trabajos realizados hasta la fecha donde se han realizados registros extracelulares (siendo el otro Rose [2005]), buscado actividad neuronal sensible al campo magnético terrestre en las principales vías magnéticas de aves. Pese a nuestro esfuerzo y trabajo sistemático en el desarrollo de los experimentos llegamos a la conclusión que tanto en el tectum óptico y el Ipc de las palomas no existen las respuestas a estímulos magnéticos en los numeros y características como los descritos por Semm y Demaine [1986].

Tenemos que considerar que los experimentos de magnetorrepción no solo se llevan a cabo con registros extracelulares, sino también con experimentos de marcadores de actividad neuronal. En los experimentos realizados con marcadores de actividad neuronal en palomas, se han utilizado como marcadores c-Fos y ZENK. Con ambos marcadores se han encontrados resultados positivos para estimulación magnética, muchos científicos consideran que este tipo de resultados son validos para ratificar casi en un 100 % uno u otro modelo de magnetorrepción en aves. En esta tesis mencionamos los experimentos mas recientes de magnetorrepción utilizando marcadores de actividad neuronal, aunque no estamos de acuerdo en un 100 % de la validez que se le asocia a estos experimentos, debido a que la actividad neuronal observada puede ser generada por estímulos periféricos (no magnéticos) o estimulación espontánea ,y también al hecho que algunos de los núcleos marcados con este método, no se encuentran asociados a los modelos de magnetorecepción como el modelos de la magnetita y el modelo par-radical.

Si consideramos por ejemplo uno de los últimos trabajos realizados con c-Fos (Wu y Dickman [2011]) donde se encuentra actividad neuronal en el hipocampo resultados que se contradicen completamente con los resultados obtenidos con registros extracelulares (Rose [2005]) donde no encuentra respuestas magnéticas en el hipocampo en palomas.

En esta tesis consideramos mas confiable realizar registros extracelulares que utilizar

marcadores de actividad neuronal, es por esto que consideramos particularmente importantes los resultados realizados por Rose [2005] donde no hay respuestas en el hipocampo y si a esto le agregamos que en esta tesis no se encontró repuestas en el tectum óptico e Ipc es de gran importancia realizar experimentos en el núcleo rotundo, núcleo que se encuentra entre el tectum óptico y el entopallio, siendo estos tres núcleos parte de la vía tectofugal la que es asociada al modelo foto-magnético, ya que al no encontrar respuestas magnéticas en el rotundo se podría considerar que la vía tectofugal no es la vía de magnetorecepción en palomas, es esta la importancia de realizar experimentos en el núcleo rotundo, experimentos que no se realizaron en esta tesis pero que serán realizadas en un futuro próximo. Como se puede apreciar el problema de la magnetorecepción en aves sigue muy abierto.

Bibliografía

- Ahmad M., Galland P., Ritz T., Wiltschko R. Y Wiltschko W. 2007. Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *arabidopsis thaliana*. *Planta*. 225 (3): 615–624.
- Azanza M.J. Y Del Moral A. 1994. Cell-membrane biochemistry and neurobiological approach to biomagnetism. *Progress in Neurobiology*., 44 (6):517–601.
- Baily M.J., Chong NW, Xiong j. Y Cassone V.M. 2002. Chikens' cry2: molecular analysis of an avian cryptochrome in retinal and pineal photoreceptors. *FEBS Lett*. 513:161–174.
- Beason R.C. 2005. Mechanisms of magnetic orientation in birds. *Integr. Comp. Biol*. 45: 565–573.
- Beason R.C., Wiltschko R. Y Wiltschko W. 1997. Pigeon homing: Effects of magnetic pulses on initial orientation. *Auk*. 114 (3):405–415.
- Begall S., Cerveny J., Neef J., Vojtech O. Y Burda H. 2008. Magnetic alignment in grazing and resting cattle and deer. *PNAS*. 105:13451–13455.
- Berson D.M. Y Hartline P.H. 1988. A tecto-rotundo-telencephalic pathway in the rattlesnake: evidence for a forebrain representation of the infrared sense. *Journal of Neuroscience*. 8(3):1074–1088.
- Bingman V.P., Ioale P., Casini G. Y P. Bagnoli. 1988. Hippocampal ablated homing pigeons show a persistent impairment in the time taken to return home. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 163 (4):559–563.
- Blakemore R.P. 1975. Magnetotactic bacteria. *Science*. 190:377–379.

- Brasel J.M., Collier A.C. Y Pritsos C.A. 2007. Differential toxic effects of carbofuran and diazinon on time of flight in pigeons (*Columba livia*): Potential for pesticide effects on migration. *Toxicology And Applied Pharmacology*. 219 (2-3):241–246.
- Burger T., Lucova M., Moritz R.E., Oelschlager H.H.A., Druga R., Burda H., Wiltschko W., Wiltschko R. Y Nemeč P. 2010. Changing and shielded magnetic fields suppress c-fos expression in the navigation circuit: input from the magnetosensory system contributes to the internal representation of space in a subterranean rodent. *Journal Of The Royal Society Interface*. 7(50):1275–1292.
- Cain S.D., Boles L.C., Wang J.H. Y Lohmann K.J. 2005a. Magnetic orientation and navigation in marine turtles, lobsters, and mollusks: Concepts and conundrums. *Integrative And Comparative Biology*. 45 (3):539–546.
- Cain S.D., Boles L.C., Wang J.H. Y Lohmann K.J. 2005b. Magnetic orientation and navigation in marine turtles. *Integr. Comp. Biol.* 45:539–546.
- Cochran W.W., Mouritsen H. Y Wikelski M. 2004. Migrating songbirds recalibrate their magnetic compass daily from twilight cues. *Science*. 304:405–408.
- Cohen-Tannoudji C., Diu B. Y Laloe F. 1996. *Quantum Mechanics*. Wiley, John & Sons, Incorporated.
- Deutschlander M.E., Phillips J.B. Y Borland S.C. 1999. The case for light-dependent magnetic orientation in animals. *Journal Of Experimental Biology*. 202 (8):891–908.
- Diego-Rasilla F.J. Y Phillips J.B. 2007. Magnetic compass orientation in larval Iberian green frogs. *Ethology*. 113:474–479.
- Edmonds D.T. 1992. A magnetite null detector as the migrating bird's compass. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences*. 249 (1324): 27–31.
- Edmonds D.T. 1993. Larmor precession as a mechanism for the detection of static and alternating magnetic-fields. *Bioelectrochemistry And Bioenergetics*. 30 (1-3):3–12.
- Edmonds D.T. 1996. A sensitive optically detected magnetic compass for animals. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences*. 263 (1368): 295–298.
- Emlen S.T. Y Emlen J.T. 1966. A technique for recording migratory orientation of captive birds. *Auk*. 83:361–367.
- Falkenberg G., Fleissner G., Schuchardt K., Kuehbacher M., Thalau P., Mouritsen H., Heyers D., Wellenreuther G. Y Fleissner G. 2010. Avian magnetoreception: elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds. *Plos One*. 5 Issue 2:e9231.

- Finney B. 1995. A role for magnetoreception in human navigation. *Current Anthropology*. 36 (3):500–506.
- Fischer J.H., Freake M.J., Borland S.C. Y Phillips J.B. 2001. Evidence for the use of magnetic map information by an amphibian. *Animal Behaviour*. 62:1–10 Part 1.
- Fleissner G., Stahl B., Talau P., Falkenberg G. Y Fleissner G. 2007. A novel concep of ferromineral-based magnetoreception: histological and physicochemical data fom the upper beak of the pigeons. *Naturwissenschaften*. 94:631–642.
- Gagliardo A., Ioale P. Y Bingman V.P. 1999. Homing in pigeons: the role of the hippocampal formation in the representation of landmarks used for navigation. *The Journal of Neuroscience*. 19(1):311–315.
- Gegear R.J., Casselman A., Waddell S. Y Reppert S.M. 2008. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in drosophila. *Nature*. 454:1014–1019.
- Gegear R.J., Foley L.E., Casselman A. Y Reppert S.M. 2010. Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature*. 463:804–808.
- Georgopoulos A.P., Kettner R.E. Y Schwartz A.B. 1988. Primate motor cortex and free arm movements to visual target in three dimensional space in coding of the direction of movements by a neuronal population. *The Journal of Neuroscience*. 8(8):2928–2937.
- Giovani B., Bryrdin M., Ahmad M. Y Brettel K. 2003. Light induced electron transfer in a cryptochrome blue light photoreceptor. *Natural Structural Biology*. 10 (6):489–490.
- Griffiths D.J. 1994. *Introduction to Quantum Mechanics*. PP 155- 169. Prentice Hall, Inc.
- Gruberg E., Dudkin E., Wang Y., Marín G., Salas C., Sentis E., Letelier J.C., Mpodozis J., Malpeli J., cui H., MA R., Northmore D. Y Udin S. 2006. Influencing and interpreting visual input: The role of a visual feedback system. *Journal of Neuroscience*. 26(41): 10368–10371.
- Heiligenberg W. 1991. Neural nets in electric fish. *MIT Press, Cambridge*.
- Heyers D., Manns M., Luksch H., Güntürkün O. Y Mouritsen H. 2007. A visual pathway links brain structures active during magnetic compass orientation in migratory birds. *Plos One*. Issue 9:e937.
- Heyers D., Zapka M., Hoffmeister M., Wild J.M. Y Mouritsen H. 2010. Magnetic field changes activate the trigeminal brainstem complex in a migratory bird. *PNAS*. 107 (20): 9394–9399.
- Jiles D. 1998. *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*. CRC Press.

- Johnsen S. Y Lohmann K.J. 2005. The physics and neurobiology of magnetoreception. *Nature Reviews Neuroscience*. 6 (9):703–712.
- Jorge P.E. Y Vicente L. 2006. Light-dependent information: influence of loft conditions on young pigeon's navigational system. *Journal Of Ornithology*. 147 (1):38–46.
- Kalmijn A.J. 1982. Electric and magnetic field detection in elasmobranch fishes. *Science*. 218:916–918.
- Karten H.J. Y Hodos W. 1967. *A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (columba livia)*. The Johns Hopkins Press.
- Keeton W.T. 1971. Magnetic interfere with pigeon homing. *PNAS*. 68:102–106.
- Kirschvink J.L., Winklhofer M. Y Walker M.M. 2010. Biophysics of magnetic orientation: strengthening the interface between theory and experimental design. *J. R. Soc. Interface*. 7:S179–S191.
- Kobayashi A. Y Kirschvink J.L. 1995. Magnetoreception and electromagnetic field effects: Sensory perception of the geomagnetic field in animals and humans. *Electromagnetic Fields - Biological Interactions And Mechanisms*. 250:367–394.
- Kramer G. 1957. Experiments on bird orientation and their interpretation. *Ibis*. 99: 196–227.
- Leucht T. 1990. Interactions of light and gravity reception with magnetic-fields in xenopus-laevis. *Journal Of Experimental Biology*. 148:325–334.
- Liboff A.R. Y Jenrow K.A. 2000. New model for the avian magnetic compass. *Bioelectromagnetics*. 21:555–565.
- Liedvogel M., Feenders G., Wada K., Troje N.F., Jarvis E.D. Y Mouritsen H. 2007. Lateralized activation of cluster n in the brains of migratory songbirds. *Eur J Neurosci*. 25(4):1166–1173.
- Liedvolgel M., Maeda K., Henbest K., Schleicher E., Simon T., Timmel C.R., Hore P.J. Y Mouritsen H. 2007. Chemical magnetoreception: Bird cryptochrome 1a ls excited by blue light and forms long-lived radical-pairs. *Plos One*. Issue10:e1106.
- Lohmann K.J. Y Lohmann C.M.F. 1993. A light-independent magnetic compass in the leatherback sea-turtle. *Biological Bulletin*. 185 (1):149–151.
- Luksch H. 2003. Cytoarchitecture of the avian optic tectum: neuronal substrate for cellular computation. *Reviews in the Neurosciences*. 14:85–106.
- Mai J.K. Y Semm P. 1990. Pattern of brain glucose-utilization following magnetic stimulation. *Journal Fur Hirnforschung*. 31 (3):331–336.

- Mann S., Sparks N.H.C. Y Board R.G. 1990. Magnetotactic bacteria: microbiology, biomineralization, paleomagnetism and biotechnology. *Advances in Microbial Physiology*. 31:125–181.
- Marín G., Mpodozis J., Sentis E., Ossandon T. Y Letelier J.C. 2005. Oscillatory bursts in the optic tectum of birds represent re-entrant signal from the nucleus isthmi pars parvocellularis. *Journal of Neuroscience*. 25(30):7081–7089.
- Marín G., Salas C., Sentis E., Rojas X., Letelier J.C. Y Mpodozis J. 2007. A cholinergic gating mechanism controlled by competitive interactions in the optic tectum of the pigeon. *Journal of Neuroscience*. 27(30):8112–8121.
- McKay B.E. Y Persinger M.A. 2005. Complex magnetic fields enable static magnetic field cue use for rats in radial maze tasks. *International Journal Of Neuroscience*. 115 (5):625–648.
- Mehlhorn J. Y Rehkamper G. 2009. Neurobiology of the homing pigeon—a review. *Naturwissenschaften*. 96 (9):1011–1025.
- Meyer C.G., Holland K.N. Y Papastamatiou Y.P. 2005. Sharks can detect changes in the geomagnetic field. *J. R. Soc. Interface*. 2:129–130.
- Mora C.V., Davison M., Wild J.M. Y Walker M.M. 2004. Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature*. 432:508–511.
- Mouritsen H. Y Ritz T. 2005. Magnetoreception and its use in bird navigation. *Current Opinion In Neurobiology*. 15 (4):406–414.
- Mouritsen H., Janssen-Bienhold U., Liedvogel M., Feenders G., Stalleicken J., Dirks P. Y R. Weiler. 2004. Cryptochrome and neural-activity markers colocalize in the retina of migratory birds during magnetic orientation. *PNAS*. 101:14294–14299.
- Muheim R., Bäckman J. Y Akesson S. 2002. Magnetic compass orientation in European robin is dependent on both wavelength and intensity of light. *Journal of Experimental Biology*. 205:3845–3856.
- Muheim R., Phillips J.B. Y Akesson S. 2006. Polarized light cues underlie compass calibration in migratory songbirds. *Science*. 313:837–839.
- Munro U., Munro J.A., Phillips J.B. Y Wiltschko W. 1997. Effect of wavelength of light and pulse magnetization on different magnetoreception systems in a migratory bird. *Australian Journal Of Zoology*. 45 (2):189–198.
- Möller A., Sagasser S., Wiltschko W. Y Schierwater B. 2004. Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften*. 91:585–588.

- Nemec P., Altmann J., Marhold S., Burda H. Y Oelschlager H.H.A. 2001. Neuroanatomy of magnetoreception: the superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal. *Science*. 294 (5541):366–368.
- Nemec P., Burda H. Y Oelschlager H.H.A. 2005. Towards the neural basis of magnetoreception: a neuroanatomical approach. *Naturwissenschaften*. 92 (4):151–157.
- Newman E.A., Gruberg E.R. Y Hartline P.H. 1980. The infrared trigemino-tectal pathway in the rattlesnake and in the python. *Journal of Comparative Comp Neurol*. 191(3): 465–477.
- Olcese J. Y Hurlbut E. 1989. Comparative studies on the retinal dopamine response to altered magnetic-fields in rodents. *Brain Research*. 498 (1):145–148.
- Olcese J., Reuss S. Y Semm P. 1988a. Geomagnetic-field detection in rodents. *Life Sciences*. 42 (6):605–613.
- Olcese J., Reuss S., Stehle J., Steinlechner S. Y Vollrath L. 1988b. Responses of the mammalian retina to experimental alteration of the ambient magnetic-field. *Brain Research*. 448 (2):325–330.
- Partch C.L. Y Sancar A. 2005. Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: The search for a photocycle. *Photochemistry And Photobiology*. 81 (6):1291–1304.
- Phillips J.B. 1977. Use of the earth's magnetic field by orienting cave salamanders. *J. comp. Physiol*. 121:273–288.
- Phillips J.B. 1996. Magnetic navigation. *Journal Of Theoretical Biology*. 180 (4):309–319.
- Phillips J.B. Y Borland S.C. 1992a. Magnetic compass orientation is eliminated under near-infrared light in the eastern red-spotted newt *notophthalmus-viridescens*. *Animal Behaviour*. 44 (4):796–797.
- Phillips J.B. Y Borland S.C. 1992b. Behavioral evidence for use of a light-dependent magnetoreception mechanism by a vertebrate. *Nature*. 359 (6391):142–144.
- Phillips J.B. Y Borland S.C. 1994. Use of a specialized magnetoreception system for homing by the eastern red-spotted newt *notophthalmus-viridescens*. *Journal Of Experimental Biology*. 188:275–291.
- Phillips J.B. Y Sayeed O. 1993. Wavelength-dependent effects of light on magnetic compass orientation in *drosophila-melanogaster*. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 172 (3):303–308.

- Phillips J.B., Muheim R. Y Jorge P.E. 2010. A behavioral perspective on the biophysics of the light-dependent magnetic compass: a link between directional and spatial perception? *Journal Of Experimental Biology*. 213(19):3247–3255.
- Picazo M.L., Catala M.D. Y Bardasano J.L. 1993. Histopathology of the harderian-gland of rodents exposed to elf magnetic-fields. *Bioelectrochemistry And Bioenergetics*. 30 (1-3):203–207.
- Ritz T., Adem S. Y Schulten K. 2000. A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophysical Journal*. 78:707–718.
- Ritz T., Dommer D.H. Y Phillips J.B. 2002. Shedding light on vertebrate magnetoreception. *Neuron*. 34 (4):503–506.
- Ritz T., Thalau P., Phillips J.B., Wiltschko R. Y Wiltschko W. 2004. Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass. *Nature*. 429:177–180.
- Ritz T., Wiltschko R., Hore P.J., Rodgers C.T., Stapput K., Thalau P., Timmel C.R. Y Wiltschko W. 2009. Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophysical Journal*. 96:3451–3457.
- Rose J. The neural basis of avian magnetic orientation. Master's thesis, University of Otago (New Zeland), 2005.
- Rowe C. 1999. Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Animal Behaviour*. 58:921–931 Part 5.
- Schneider T. 1995. Distribution of 2-[i-125]iodomelatonin binding-sites in the brain of the pied flycatcher (*ficedula-hypoleuca*) and the zebra finch (*taeniopygia-guttata*). *Journal Of Experimental Biology*. 198 (9):1943–1949.
- Semm P. Y Beason R.C. 1990a. Sensory basis of bird orientation. *Experientia*. 46 (4): 372–378.
- Semm P. Y Beason R.C. 1990b. Responses to small magnetic variations by the trigeminal system of the bobolink. *Brain Res. Bull*. 25:735–740.
- Semm P. Y Demaine C. 1986. Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. *J. Comp. Physiol. A*. 159:619–625.
- Semm P., Nohr D., Demaine C. Y Wiltschko W. 1984. Neural basis of the magnetic compass interactions of visual magnetic and vestibular inputs in the pigeon's brain. *Journal of Comparative Physiology A*. 155:283–288.
- Shcherbakov V.P. Y Winklhofer M. 1999. The osmotic magnetometer: a new model for magnetite-based magnetoreceptors in animals. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*. 28 (5):380–392.

- Solov'yov I.A. Y Greiner W. 2007. Theoretical analysis of an iron mineral-based magnetoreceptor model in birds. *Biophysical Journal*. 93:1493–1509.
- Solov'yov I.A., Chandler D.E. Y Schulten K. 2007. Magnetic field effects in arabodopsis thaliana cryptochrome-1. *Biophysical Journal*. 92:2711–2726.
- Stehle J., Reuss S., Schroder H., Henschel M. Y Vollrath L. 1988. Magnetic-field effects on pineal n-acetyltransferase activity and melatonin content in the gerbil - role of pigmentation and sex. *Physiology & Behavior*. 44 (1):91–94.
- Taube J.S. 1998. Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Progress In Neurobiology*. 55 (3):225–256.
- Thoss F. Y Bartsch B. 2003. The human visual threshold depends on direction and strength of a weak magnetic field. *Journal Of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 189 (10):777–779.
- Thoss F., Bartsch B., Fritzsche B., Tellschaft D. Y Thoss M. 2000. The magnetic field sensitivity of the human visual system shows resonance and compass characteristics. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 186 (10):1007–1010.
- Thoss F., Bartsch B., Tellschaft D. Y Thoss M. 2002. The light sensitivity of the human visual system depends on the direction of view. *Journal Of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 188 (3):235–237.
- Tian L., Xiao B., Lin W., Zhang S., Zhu R. Y Pan Y. 2007. Testing for the presence of magnetite in the upper-beak skin of homing pigeons. *Biometals*. 20 (2):197–203.
- Vargas J.P., Siegel J.J. Y Bingman V.P. 2006. The effects of a changing ambient magnetic field on single-unit activity in the homing pigeon hippocampus. *Brain Research Bulletin*. 70:158–164.
- Viguiet C. 1882. Les sens de l'orientation et ses organes chez les animaux et chez l'homme. *Revue Philosophique de la France et de l'étranger*. 15:1–36.
- von Middendorff A. 1859. Die isepiptesen russlands. *Memoires de l'Academie Imperiale des Sciences de St Petersburg VI*. 8:1–143.
- Walcott C., Gould J.L. Y Lednor A.J. 1988. Homing of magnetized and demagnetized pigeons. *Journal Of Experimental Biology*. 134:27–41.
- Wallraff H.G. Y Sinsch U. 1988. The role of outward-journey information in homing experiments with pigeons - new data on ontogeny of navigation and general survey. *Ethology*. 77 (1):10–27.
- Wang Y., Pan Y., Parsons S., Walker M. Y Zhang S. 2007. Bats respond to polarity of magnetic field. *Proc. R. Soc. B*. 274:2901–2905.

- Wiltschko R., Munro U., Ford H., Stapput K. Y Wiltschko W. 2008. Light-dependent magnetoreception: orientation behaviour of migratory birds under dim red light. *Journal Of Experimental Biology*. 211 (20):3344–3350.
- Wiltschko R., Stapput K., Thalau P. Y Wiltschko W. 2010. Directional orientation of birds by the magnetic field under different light conditions. *Journal Of The Royal Society Interface*. 7:S163–S177 Suppl. 2.
- Wiltschko W. 1968. Über den einfluss statischer magnetfelder auf die zugorientierung der rotkehlchen (*erithacus rubecula*). *Zeitschrift fur Tierpsychologie*. 25:537–558.
- Wiltschko W. Y Wiltschko R. 1995. Migratory orientation of european robins is affected by the wavelength of light as well as by a magnetic pulse. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 177 (3):363–369.
- Wiltschko W. Y Wiltschko R. 2002. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften*. 89:445–452.
- Wiltschko W. Y Wiltschko R. 2005. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal Of Comparative Physiology A-Neuroethology Sensory Neural And Behavioral Physiology*. 191 (8):675–693.
- Wiltschko W. Y Wiltschko R. 2006. Magnetoreception. *Bioessays*. 28 (2):157–168.
- Wiltschko W. Y Wiltschko R. 2007. Magnetoreception in birds: two receptors for two different tasks. *Journal Of Ornithology*. 148:S61–S76 Suppl. 1.
- Wiltschko W., Munro H., Ford H. Y Wiltschko R. 1993. Red-light disrupts magnetic orientation of migratory birds. *Nature*. 364 (6437):525–527.
- Wiltschko W., Munro U., Beason R.C., Ford H. Y R. Wiltschko. 1994. A magnetic pulse leads to a temporary deflection in the orientation of migratory birds. *Experientia*. 50 (7):697–700.
- Wiltschko W., Traudt J., Gunturkun O., Prior H. Y Wiltschko R. 2002. Lateralization of magnetic compass orientation in a migratory bird. *Nature*. 419:467–470.
- Wiltschko W., Moller A., Gesson M., Noll C. Y Wiltschko R. 2004. Light-dependent magnetoreception in birds: analysis of the behaviour under red light after pre-exposure to red light. *Journal Of Experimental Biology*. 207 (7):1193–1202.
- Wiltschko W., Munro U., Ford H. Y Wiltschko R. 2006. Bird navigation: What type of information does the magnetite-based receptor provide? *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*. 273 (1603):2815–2820.
- Wiltschko W., Freire R., Munro U., Ritz T., Rogers L., Thalau P. Y Wiltschko R. 2007. Magnetic compass of domestic chickens, *gallus gallus*. *Journal of Experimental Biology*. 210:2300–2310.

- Wu Le-Qing Y Dickman J. D. 2011. Magnetoreception in an avian brain in part mediated by inner ear lagena. *Current biology*. 21:418–423.
- Yano A., Sato A., Miyata T., Mizutani Y., Sakaki Y., Kitamura S., Ikuta K. Y Ogura M. 1996. Behavioral tests for magnetic sensitivity of hime salmon (kokanee: Land-locked sockeye salmon *oncorhynchus nerka*). *Nippon Suisan Gakkaish*. 62 (6):911–919.
- Zeugner A., Byrdinb M., Bouly J.P., Bakrim N., Giovani B., Brettel K. Y Ahmad M. 2005. Light-induced electron transfer in arabidopsis cryptochrome 1 correlates with in-vivo function. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.