

Evaluación del efecto de campos magnéticos sobre la generación de ATP mitocondrial

Viviana Pimiento Suárez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Maestría en Química

Director

Mario Negrette Guzmán, Doctor en Ciencias Bioquímicas

Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina UIS

Codirector

David Miranda Mercado, Doctor en Química.

Escuela de Física UIS

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

Este libro está dedicado a mi hijo, Simón Esteban. Tú, baby eres mi mayor aventura

¡Te amo con todo mi corazón!"

Que este libro sea el inicio de mil viajes maravillosos.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al profesor Mario Negrette, director de este proyecto, y al profesor David Miranda, codirector, por su valiosa guía, apoyo y acompañamiento constante durante todo el desarrollo de esta investigación. También extendo mi gratitud al grupo de investigación FARMET y a mis compañeros de laboratorio, Sebastián, Liz, Alexander y Brigit, por su colaboración y compañerismo.

Agradezco profundamente a la profesora Stelia Carolina Méndez, así como a los grupos de investigación GIBIM y CIMBIOS, por el respaldo y los recursos brindados. Mi reconocimiento al Bioterio de la Universidad Industrial de Santander por su apoyo técnico y al señor Jesús y Eduardo por estar pendientes en mis visitas al bioterio.

Quisiera destacar la ayuda de Ely Daniel, quien durante su pasantía posdoctoral me brindó acompañamiento en el montaje experimental, y la colaboración del profesor Bladimiro Rincón Orozco y de Brigitte Peña, quienes contribuyeron de manera fundamental en el cultivo celular.

También, agradezco de todo corazón a mis queridos padres por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional con el cuidado de Simón Esteban durante la realización de esta maestría, así como a todas las personas que de alguna manera colaboraron en el desarrollo de este proyecto.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Marco teórico	15
2. Estado del arte	21
3. Planteamiento del problema	24
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos Específicos.....	27
6. Metodología	27
7.1 Actividad 1. Montaje experimental para la exposición a campos magnéticos, obtención de mitocondrias y cultivo de la línea celular C2C12 y desarrollo de una metodología para determinar la influencia de campos magnéticos sobre células y mitocondrias aisladas	29
7.1.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata	32
7.1.2 Cultivo de células C2C12.....	35
7.2 Actividad 2. Evaluación del efecto de campos magnéticos externos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata y cultivo de células C2C12.....	35
7.3 Actividad 3. Evaluación del efecto de campos magnéticos externos sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular C2C12.	38
8. Resultados	41
8.1 Construcción del montaje experimental para desarrollo de una metodología para determinar la influencia de campos magnéticos sobre células y mitocondrias aisladas.	41

8.2	Medición del efecto de campos magnéticos externos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata y células musculares C2C12.....	43
8.3	Evaluación del efecto de campos magnéticos externos sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata y células musculares C2C12.	50
8.3.1.	Medición de la producción de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata.....	50
8.3.2	Medición de la producción de ATP células musculares C2C12	52
9.	Discusión.....	54
10.	Conclusiones	59
11.	Recomendaciones.....	61
	Referencias Bibliográficas	62

Lista de figuras

Figura 1. Acoplamiento de la cadena de transporte de electrones con la fosforilación oxidativa.	17
Figura 2. Metodología del proyecto de investigación.	27
Figura 3. Instrumentos para la generación de campos magnéticos estáticos en material biológico.....	30
Figura 4. Portamuestra de tres compartimentos fabricado en teflón.....	31
Figura 5. Sistema de control de temperatura.....	32
Figura 6. Cinética de reacción enzimática de producción de ATP.	39
Figura 7. Configuración experimental para la exposición de mitocondrias y células a campos magnéticos.....	42
Figura 8. Cultivo de la línea celular C2C12 con aproximadamente 95% de confluencia.....	43
Figura 9. Efecto de campos magnéticos estáticos sobre el ICR de mitocondrias aisladas de hígado de rata..	45
Figura 10. Efecto de campos magnéticos estáticos sobre el ICR de células C2C12.....	49
Figura 11. Efecto de campos magnéticos estáticos sobre la generación de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata.	51
Figura 12. Efecto de campos estáticos sobre la generación de ATP en células musculares C2C12.....	53

Lista de tablas

Tabla 1. Condiciones del diseño experimental.....	29
Tabla 2. Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para mitocondrias expuestas a campo magnético de 150 mT.	43
Tabla 3. Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para mitocondrias expuestas a campo magnético de 300 mT.	44
Tabla 4. Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para mitocondrias expuestas a campo magnético de 450 mT.	44
Tabla 5. Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para las células C2C12 expuestas a campo magnético de 150mT.	46
Tabla 6. Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para las células C2C12 expuestas a campo magnético de 300 mT.	47
Tabla 7. Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para las células C2C12 expuestas a campo magnético de 450 mT.	48
Tabla 8. Intensidad de fluorescencia asociada a la producción de ATP en mitocondrias expuestas a un campo magnético de 150 mT.....	50
Tabla 9. Intensidad de fluorescencia asociada a la producción de ATP en mitocondrias expuestas a un campo magnético de 300 mT.....	50
Tabla 10. Intensidad de fluorescencia asociada a la producción de ATP en mitocondrias expuestas a un campo magnético de 450 mT.....	51
Tabla 11. Intensidad de fluorescencia debido a la producción de ATP en células C2C12 expuestas a un campo magnético de 150 mT.....	52

Tabla 12. Intensidad de fluorescencia debido a la producción de ATP en células C2C12 expuestas a un campo magnético de 300 mT.....	52
Tabla 13. Intensidad de fluorescencia debido a la producción de ATP en células C2C12 expuestas a un campo magnético de 450 mT.....	52

Resumen

Título: Evaluación del efecto de campos magnéticos sobre la generación de ATP mitocondrial*

Autor: Viviana Pimiento Suarez**

Palabras Clave: mitocondrias, células, campos magnéticos

Mediante este estudio se evaluó el efecto de campos magnéticos estáticos (150, 300 y 450 mT) aplicados durante diferentes tiempos de exposición (15, 30, 45 y 60 minutos) sobre la función mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata y células C2C12. Se midieron dos parámetros bioenergéticos clave: la producción de ATP mediante fluorescencia y el consumo de oxígeno con respirometría de alta resolución. Los resultados mostraron que no hubo un cambio significativo en la producción de ATP tras la exposición a campos magnéticos, pero sí una reducción en el índice de control respiratorio (ICR), sugiriendo una disfunción mitocondrial mediada por la exposición a campos magnéticos estáticos.

En conjunto, los resultados sugieren que la exposición a campos magnéticos, bajo condiciones controladas, pueden alterar la eficiencia bioenergética celular y mitocondrial.

Aunque estos ensayos preliminares no permiten dilucidar el mecanismo exacto de la disfunción mitocondrial mediada por campos magnéticos estáticos, son un primer acercamiento que permitirá diseñar futuros estudios para comprender la interacción de los componentes de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa con campos magnéticos. Se espera que estos resultados tengan un impacto significativo en la biología y la biomedicina.

* Trabajo de Grado

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Maestría en Química. Director: Mario Negrete Guzmán, Doctor en Ciencias Bioquímicas. Codirector: David Miranda Mercado, Doctor en Química*

Abstract

Title: Evaluation of the effect of magnetic fields on mitochondrial ATP generation*

Author: Viviana Pimiento Suarez**

Key Words: mitochondria, cells, magnetic fields

This study evaluated the effect of static magnetic fields (150, 300, and 450 mT) applied for different exposure times (15, 30, 45, and 60 minutes) on mitochondrial function in C2C12 cells and isolated rat liver mitochondria. Two key bioenergetic parameters were measured: ATP production by fluorescence and oxygen consumption using high-resolution respirometry.

The results showed no significant change in ATP production after exposure to magnetic fields, accompanied by a reduction in the respiratory control ratio, suggesting mitochondrial dysfunction mediated by exposure to static magnetic fields.

Overall, the findings suggest that exposure to magnetic fields, under controlled conditions, can alter cellular and mitochondrial bioenergetic efficiency. Although these preliminary assays do not allow elucidation of the exact mechanism underlying static magnetic field-induced mitochondrial dysfunction, they represent an initial approach that will guide future studies aimed at understanding the interaction between elements of the electron transport chain and oxidative phosphorylation with magnetic fields. These results are expected to have a significant impact on biology and biomedicine.

*Thesis

**Faculty of Sciences. School of Chemistry. Master's in Chemistry. Advisor: Mario Negrete Guzmán, Doctor en Ciencias Bioquímicas. Co-advisor: David Miranda Mercado, Doctor en Química*

Introducción

Las mitocondrias son conocidas principalmente como los sitios de producción de ATP respiratorio y son esenciales para la vida eucariótica. Tienen su propio genoma, pero la gran mayoría de las proteínas mitocondriales están codificadas por el genoma nuclear y se importan a las mitocondrias (Annesley & Fisher, 2019). Estos organelos forman una red dinámica e interconectada que está íntimamente integrada con otros compartimentos celulares. Además, las funciones mitocondriales se extienden más allá de los límites de la célula e influyen en la fisiología de un organismo al regular la comunicación entre células y tejidos (Nunnari & Suomalainen, 2012).

La función fisiológica predominante de las mitocondrias es la generación de ATP por fosforilación oxidativa, pero las funciones adicionales incluyen la generación y desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ERO), la participación en algunas formas de apoptosis, la regulación del calcio del citoplasma y la matriz mitocondrial, la síntesis y catabolismo de metabolitos y el transporte de los propios orgánulos a ubicaciones correctas dentro de la célula (Nunnari & Suomalainen, 2012). Una anomalía en cualquiera de estos procesos se denomina disfunción mitocondrial (Brand & Nicholls, 2011).

La síntesis de ATP en la mitocondria depende de una serie de procesos que involucran el movimiento de iones, moléculas y cargas eléctricas. Este proceso inicia con el transporte de electrones a través de los complejos I a IV de la cadena respiratoria, que constituyen el núcleo de conservación de energía del sistema. Estos complejos bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana, generando así un gradiente electroquímico (Brand & Nicholls, 2011).

Este gradiente impulsa la actividad de la FoF1 ATP sintasa (también conocida como complejo V), un complejo enzimático formado por dos dominios principales: una porción transmembrana denominada Fo (cuyo nombre proviene de su sensibilidad a la oligomicina) y una porción soluble, F1, orientada hacia la matriz mitocondrial (Bonora et al., 2015).

La subunidad Fo está formada por las subunidades a, b₂ y un anillo de subunidades c (en un número de 8 a 14, según la especie), que actúa como un nano-rotor por el que transitan los protones hacia la matriz. Durante este paso, los protones describen una trayectoria circular a través del anillo c, generando un movimiento rotacional que es transmitido a la subunidad F1, donde se cataliza la formación de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Ahmad & Cox, 2014).

Adicionalmente, la actividad de los complejos respiratorios I, II y III requiere de la presencia de grupos hierro-azufre (Fe-S), estructuras prostéticas esenciales para la transferencia de electrones. Estas estructuras también son indispensables para la actividad de múltiples proteínas mitocondriales, como las ferredoxinas, y para la biosíntesis de cofactores como el ácido lipoico y la biotina (Przybyla-Toscano et al., 2021). Los grupos Fe-S participan en reacciones redox, estabilización de proteínas y en la activación de sustratos.

Asimismo, la mitocondria contiene grupos hemo, derivados de la protoporfirina IX, que forman parte de enzimas como las hemoperoxidasas. Estas se agrupan en dos superfamilias evolutivamente distintas: una presente en mamíferos y otra en organismos no animales (Zederbauer et al., 2007).

Durante la respiración mitocondrial, el oxígeno molecular (O₂) actúa como aceptor final de electrones y permite la generación del gradiente de protones a lo largo de las crestas

mitocondriales (Osellame et al., 2012). A su vez, el calcio (Ca^{2+}) juega un papel regulador clave. Su ingreso a la matriz mitocondrial ocurre como respuesta a señales citoplasmáticas y modula la actividad de enzimas limitantes del ciclo de Krebs, aumentando la producción de energía en condiciones de alta demanda.

Otro ion fundamental en la función mitocondrial es el potasio (K^+), el segundo catión más abundante del cuerpo humano. Su ingreso a la mitocondria se da a través de canales activados por Ca^{2+} , y contribuye a la regulación del volumen mitocondrial, el metabolismo energético y la generación controlada de especies reactivas de oxígeno mediante un leve desacoplamiento (Gunter & Gunter, 1994).

Dado que todos estos procesos implican el movimiento de cargas eléctricas (protones, electrones, aniones o cationes), es razonable suponer que pueden interactuar con campos magnéticos, tanto internos como externos. Según la ley de Biot–Savart, toda corriente eléctrica genera un campo magnético perpendicular al plano del movimiento. Así, el flujo de protones a través del anillo c o el desplazamiento de iones cargados en la mitocondria podrían generar campos magnéticos endógenos (Adachi et al., 2010).

No obstante, hasta el momento, la posibilidad de que estos movimientos de cargas sean influenciados por campos magnéticos externos ha sido poco estudiada. Tampoco se ha evaluado de manera sistemática el impacto que estos campos podrían tener sobre la producción de ATP, el consumo de oxígeno y, en general, sobre la eficiencia bioenergética mitocondrial. Por tanto, se ha planteado un abordaje teórico-experimental para este problema.

Desde el punto de vista teórico, nuestro grupo de investigación ha trabajado en modelados computacionales con el objetivo de obtener la descripción de las propiedades

magnéticas de la ATP sintasa mitocondrial como uno de los potenciales generadores de campos magnéticos intrínsecos y, por tanto, uno de los sistemas moleculares que más susceptibilidad magnética podría aportar a las mitocondrias. Por otra parte, con el presente trabajo se buscó aportar evidencia experimental, evaluando directamente la respuesta bioquímica de mitocondrias aisladas y células ricas en mitocondrias expuestas a campos magnéticos controlados. Así, se planteó un abordaje experimental para la evaluación de la bioenergética mitocondrial y celular en mitocondrias aisladas de hígado de rata y en células musculares de la línea C2C12 expuestas a campos magnéticos externos. Las mitocondrias y células se expusieron a campos magnéticos externos con valores nominales de 150, 300 y 450 mT durante 15, 30, 45 y 60 minutos. Luego, se determinó el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 para calcular el índice de control respiratorio (ICR) y se midió la producción de ATP.

La metodología planteada permitió obtener resultados que evidencian efectos de los campos magnéticos externos sobre el ICR. Aunque estos resultados no arrojan suficiente información para proponer mecanismos de acción que expliquen estos efectos, conocer esta información básica podría impactar de manera imprevisible campos aplicados de la biología celular, la bioquímica, la ecología o la medicina. En esta última se podría abrir un nuevo enfoque para el estudio de ciertas enfermedades asociadas a alteraciones en el metabolismo, la función y la integridad de las mitocondrias.

El presente documento está organizado en 10 secciones en las que se introduce al contexto general de la investigación, se revisan fundamentos teóricos sobre bioenergética mitocondrial y propiedades magnéticas de sistemas biológicos y se muestran los antecedentes relacionados con la interacción de campos magnéticos y procesos celulares y subcelulares. Después del

planteamiento del problema, la hipótesis y los objetivos del proyecto, se continúa con una descripción detallada del enfoque experimental empleado. Se presentan los resultados obtenidos acompañados del análisis estadístico y su respectiva discusión para, finalmente, exponer las conclusiones generales y algunas recomendaciones basadas en los hallazgos encontrados durante el proyecto.

1. Marco teórico

Estructura y función de las mitocondrias

Las mitocondrias son organelos celulares eucariotas encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para todas las funciones celulares (Facundo et al., 2006). Actúan como centrales energéticas de la célula y sintetizan ATP a expensas de los sustratos metabólicos (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos). Las mitocondrias son organelos que se dividen y fusionan. Su tamaño oscila entre 0,5 y 1 μm de diámetro y hasta 8 μm de longitud. Su número depende de las necesidades energéticas de la célula. Al conjunto de las mitocondrias de la célula se le denomina condrioma celular (Nelson & Cox, 2018). Las mitocondrias están recubiertas por dos membranas claramente diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Wang, Zhang, et al., 2018).

La membrana externa es una bicapa lipídica permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos. Eso es debido a la presencia de muchas copias del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), también llamado porina, que permiten el paso de grandes moléculas de hasta 5000 Da y un diámetro aproximado de 20 Å. La membrana externa realiza relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte. Contiene entre un 60 y un 70 % de proteínas (Baker et al., 2007).

La membrana interna contiene más proteínas (80%), carece de poros y es altamente selectiva; contiene muchos complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembrana que están implicados en la translocación de moléculas. Además, la ultraestructura de las mitocondrias en la mayoría de los eucariontes se caracteriza por la presencia de crestas mitocondriales, las cuales consisten en tabiques aplanados perpendiculares al eje de la mitocondria. En la membrana de las crestas se llevan a cabo funciones relacionadas con el metabolismo oxidativo como la cadena respiratoria o la fosforilación oxidativa (Brown, 1992).

La matriz mitocondrial contiene menos moléculas que el citosol, aunque contiene iones, metabolitos a oxidar, ADN circular bicatenario muy parecido al de las bacterias, ribosomas tipo 55S (70S en vegetales) y ARN mitocondrial; es decir, tienen los componentes que tendría una célula procariota de vida libre. En la matriz mitocondrial tienen lugar diversas rutas metabólicas clave para la vida, como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de los ácidos grasos; también se oxidan los aminoácidos y se localizan algunas reacciones de la síntesis de urea y grupos hemo (Pollard et al., 2016).

La principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, la cual es dependiente de la cadena transportadora de electrones; el ATP producido en la mitocondria supone un porcentaje muy alto del ATP sintetizado por la célula. Las mitocondrias también sirven como almacén de sustancias como iones, agua y proteínas (Wang, Wang, et al., 2018).

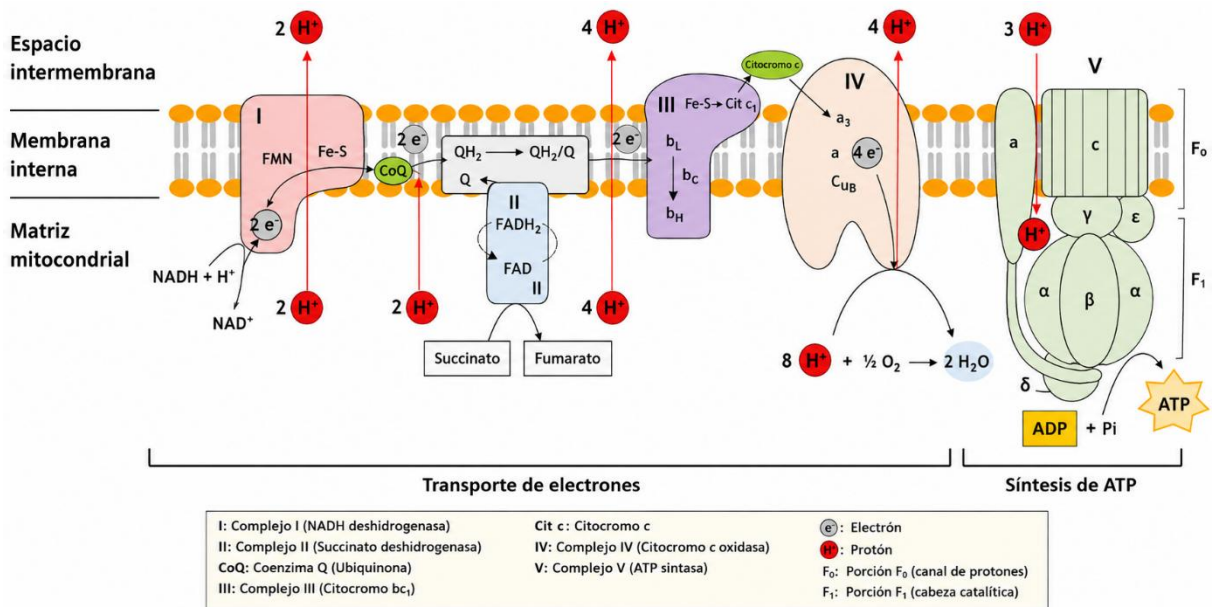
Cadena respiratoria mitocondrial

La cadena respiratoria mitocondrial, o cadena de transporte de electrones (**Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), está embebida en la membrana interna

mitocondrial y la constituyen cinco complejos multienzimáticos (I, II, III, IV y V o ATP sintasa) y dos transportadores de electrones móviles (coenzima Q o ubiquinona y citocromo c) (Nelson & Cox, 2018). La composición completa de cada complejo individual es conocida y se sabe que estos establecen interacciones para formar estructuras supramoleculares de orden superior llamadas supercomplejos y respirosomas (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018).

Figura 1.

Acoplamiento de la cadena de transporte de electrones con la fosforilación oxidativa.



Nota. Adaptado de Chan, E.C.S. et. al. (2007)

La cadena de transporte de electrones está organizada como un conjunto de complejos multiproteicos que oxidan el dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida (NADH) y el dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH₂). El NADH es oxidado en el complejo I, y sus electrones son transferidos a través de los complejos III y IV hasta el oxígeno. Por su parte, el FADH₂ es oxidado en el complejo II, y sus electrones son posteriormente transferidos al oxígeno también a través de los complejos III y IV. Adicionalmente, otras flavoproteínas

asociadas a la membrana mitocondrial interna, como la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y la dihidroorotato deshidrogenasa, pueden transferir electrones derivados del FADH_2 al complejo III.

De manera acoplada a la transferencia de electrones, se produce el bombeo de protones (H^+) a través de la membrana mitocondrial interna, desde la matriz hacia el espacio intermembrana (ver Figura 1). Este proceso genera un gradiente electroquímico de protones, compuesto por un gradiente de concentración y un gradiente eléctrico debido a la carga positiva de los protones (Acín-Pérez et al., 2008).

El gradiente electroquímico resultante impulsa la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa, en un proceso conocido como fosforilación oxidativa. Este proceso constituye una de las vías mejor caracterizadas a nivel bioquímico, genético, molecular y estructural. Su relevancia radica en que representa la principal fuente de energía en la mayoría de las células, además de participar en la regulación del estado redox celular, diversas rutas metabólicas y procesos como la apoptosis (Lobo-Jarne & Ugalde, 2018).

En el análisis de la respiración mitocondrial se distinguen dos estados principales: estado 3 y estado 4. El estado 3 corresponde a una condición en la que hay disponibilidad de ADP, lo que estimula la cadena de transporte de electrones y favorece una alta tasa de respiración asociada a la síntesis activa de ATP. En contraste, el estado 4 se presenta cuando el ADP se ha agotado, lo que reduce la actividad respiratoria a niveles basales (Barrientos et al., 2009).

Campos magnéticos

Un campo magnético es un campo vectorial que describe la influencia magnética sobre cargas eléctricas en movimiento, corrientes eléctricas y materiales magnéticos. Una carga en movimiento dentro de un campo magnético experimenta una fuerza perpendicular tanto a su velocidad como al campo aplicado (Rosensweig, 2002).

La ley de Biot-Savart (Ecuación 1) permite calcular el campo magnético \vec{B} en una posición \vec{r} , generado por una corriente I de cargas eléctricas que circulan a lo largo de una trayectoria l , donde μ_0 corresponde a la permeabilidad magnética del vacío (Ferraro et al., 2005):

$$\vec{B}(\vec{r}) = \int \frac{\mu_0 I d\vec{l} \times \vec{r}}{4\pi |\vec{r}|^3}$$

(Ecuación 1)

En sistemas biológicos, como las células y las mitocondrias, el movimiento de cargas (iones y moléculas cargadas) puede generar campos magnéticos locales. Estos campos pueden ser constantes si la corriente es constante, o variables en el tiempo si dicha corriente fluctúa.

En presencia de un campo magnético externo, la corriente I puede verse modificada dependiendo de las propiedades del medio. Por ejemplo, en materiales paramagnéticos o ferromagnéticos, el campo inducido tiende a alinearse con el campo externo. En contraste, en materiales diamagnéticos, se genera una respuesta opuesta al campo aplicado, en concordancia con la ley de Lenz (Serway & Jewett, 2009).

Cuando la intensidad del campo magnético no varía en el tiempo, se denomina campo magnético estático. Por el contrario, si la intensidad cambia con el tiempo, se habla de campo magnético dinámico o variable. Dentro de estos últimos, los campos magnéticos pulsados son los más comunes, incluyendo los generados por corriente alterna (50–60 Hz) y radiofrecuencia (Wang et al., 2018).

Según su distribución espacial, los campos magnéticos pueden clasificarse como homogéneos o no homogéneos, dependiendo de si la intensidad del campo es constante o variable en el espacio. En electroimanes diseñados para generar campos estáticos, la región central suele proporcionar un campo homogéneo, siempre que las muestras se ubiquen dentro de un rango específico (Wang et al., 2018).

En este contexto, es importante considerar que, bajo condiciones de exposición controladas y campos magnéticos homogéneos, la respuesta observada dependerá de las propiedades magnéticas intrínsecas de los sistemas biológicos. De acuerdo con Nishida y Silver (2012), en células vivas sin suplementación con hierro se esperaría un comportamiento predominantemente diamagnético. Sin embargo, la presencia de hierro, grupos hemo u otros centros redox podría generar micro dominios paramagnéticos dinámicos, asociados al flujo de electrones, cambios redox y movimientos conformacionales de proteínas respiratorias. Aunque estos autores no proponen mecanismos de magnetorrecepción, sus resultados sugieren que procesos bioenergéticos podrían verse modulados por campos magnéticos externos.

2. Estado del arte

En las últimas décadas ha aumentado el interés por comprender los efectos de los campos magnéticos sobre los sistemas biológicos. Aunque se han estudiado ampliamente los posibles riesgos y aplicaciones terapéuticas de estos campos, su influencia sobre la bioenergética mitocondrial sigue siendo un área en desarrollo.

Estudios previos han demostrado que la exposición a campos magnéticos de baja frecuencia y diferente intensidad puede modular procesos celulares clave como la proliferación, el estrés oxidativo y la actividad enzimática mitocondrial (Funk et al., 2009).

Según revisó Schenck (2005), la presencia de un campo magnético estático podría producir efectos físicos y químicos en los tejidos humanos. Entre estos efectos podemos encontrar: fuerzas magnéticas debidas a diferencias de susceptibilidad de tejidos; pares magnéticos debido a susceptibilidades anisotrópicas; corrientes inducidas por flujo o movimiento que provocan estimulación nerviosa o muscular; cambios en las velocidades de reacciones químicas; fuerzas y presiones hidrodinámicas; y excitación magnética de receptores sensoriales que conduce a sensaciones como náuseas y vértigo (Schenck, 2005).

El tipo de campo magnético aplicado al sistema biológico puede determinar el efecto observado. Al exponer células GH3 (glándula pituitaria de rata) a campos magnéticos pulsados de 50 Hz y 1 mT, se observó que aumenta la proliferación (Grassi et al., 2004). Sin embargo,

cuando esta misma línea celular se expuso a campos magnéticos estáticos de 0.5 T, se inhibió su reproducción (Rosen & Chastney, 2009).

El tiempo de exposición es otro factor clave que contribuye a los efectos diferenciales de los campos magnéticos en muestras biológicas. Por ejemplo, células linfocíticas U937, caracterizadas por su capacidad para producir lisozimas y por su gran actividad esterasa, fueron expuestas a campos magnéticos estáticos de 6 mT, observándose cambios en la forma de las microvellosidades de la superficie celular a las 24 h de exposición. Sin embargo, al dejarlas expuestas por más tiempo, tomaron una forma celular distorsionada (Chionna et al., 2003).

Alfonsina y colaboradores (2005) observaron que el citoesqueleto de células de cáncer hepático humano HepG2 expuestas a campos magnéticos estáticos de 6 mT se modificó en una manera dependiente del tiempo de exposición (Chionna et al., 2005). Años más tarde, se comprobó que la prolongación del tiempo de exposición desde 1 min hasta 3 h aumenta los efectos inducidos por campos magnéticos estáticos de 587 mT sobre la velocidad de los glóbulos rojos y la densidad de los vasos funcionales en un modelo de tumores implantados en hámsteres dorados (Strieth et al., 2008).

Por otra parte, la mayoría de las máquinas de resonancia magnética de los hospitales tienen sus componentes principales que proporcionan campos magnéticos estáticos de 0.5 T a 3 T (Wang, Wang, et al., 2018). Para evaluar la exposición del personal que trabaja con máquinas de resonancia magnética, Iachininoto et al. utilizaron un sistema de exposición que reproduce señales medidas de resonancia magnética nuclear de 1.5 T y 3 T, e investigaron sus efectos sobre las células madre hematopoyéticas. La exposición *in vitro* de células progenitoras

hematopoyéticas CD34+ obtenidas de donantes de sangre no afectó la proliferación celular, pero indujo la expansión de los progenitores eritroides y monocitos. Se encontró un comportamiento similar en células CD34+ aisladas de trabajadores en resonancia magnética, lo que sugiere que otras células y/o factores del microambiente podrían prevenir los efectos del gradiente de los campos magnéticos no homogéneos sobre las células madre hematopoyéticas en humanos (Iachininoto et al., 2016). Hasta el momento, no se han informado efectos perjudiciales de la resonancia magnética en los miembros regulares del personal que trabaja con esta tecnología.

Se ha investigado el efecto de campos magnéticos sobre la generación de energía metabólica. Zhao et al. (2011) estudiaron células híbridas de hámster-humano y encontraron que un campo magnético estático de 8.5 T disminuyó el nivel de ATP celular y aumentó el nivel de especies reactivas de oxígeno (ERO) (G. Zhao et al., 2011). Nakahara et al. (2002) encontraron que un campo magnético estático de 10 T no afectaba por sí solo la distribución o proliferación en células de ovario de hámster chino, a menos que se combinara con un tratamiento con rayos X (Nakahara et al., 2002).

Así mismo, se han expuesto células suprarrenales de rata PC12 para comparar campos magnéticos estáticos de diferentes intensidades por sus efectos sobre los niveles de ATP. Los resultados mostraron que, aunque los campos magnéticos estáticos de 0.26 o 0.50 T no afectan los niveles de ATP, los de 1 a 9 T afectaron el nivel de ATP de manera significativa y dependiente del tiempo. Además, las fluctuaciones del nivel de ATP inducidas por los campos se asociaron con cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Este estudio proporcionó

información, no sólo sobre la comprensión de varios efectos celulares de los campos magnéticos estáticos, sino también sobre sus potenciales aplicaciones clínicas (Wang, Wang, et al., 2018).

Hay estudios que indican que los campos magnéticos pueden inducir efectos beneficiosos a nivel mitocondrial, como el aumento en la producción de ATP o la mejora del metabolismo energético (R. Zhao et al., 2019). Otros advierten de posibles efectos perjudiciales como el desacoplamiento mitocondrial, el aumento de radicales libres o la apoptosis (Y. Kim et al., 2013). Esta dualidad de efectos sugiere que los resultados dependen en gran medida de las condiciones experimentales específicas.

Un aspecto poco explorado en la literatura es la comparación directa entre los efectos de los campos magnéticos sobre células completas y sobre mitocondrias aisladas. Esta comparación es fundamental para distinguir entre los efectos directos sobre la maquinaria mitocondrial y aquellos mediados por otros componentes celulares, como señales de estrés o vías de respuesta adaptativa.

3. Planteamiento del problema

La producción de energía en las células eucariotas depende fundamentalmente del adecuado funcionamiento de las mitocondrias, organelos encargados de generar ATP a través de la fosforilación oxidativa. Alteraciones en este proceso pueden comprometer la homeostasis celular, inducir estrés oxidativo y contribuir a diversas enfermedades metabólicas y degenerativas. La evaluación funcional de las mitocondrias mediante parámetros como el consumo de oxígeno y la producción de ATP es esencial para entender su estado bioenergético frente a distintos estímulos físicos o químicos.

En las últimas décadas, ha aumentado la exposición humana y ambiental a campos magnéticos generados por dispositivos eléctricos, médicos e industriales. Aunque su uso en terapias físicas y diagnóstico por imágenes se ha expandido, los posibles efectos biológicos de estas exposiciones no se comprenden completamente. Diversos estudios han reportado que los campos magnéticos pueden alterar la dinámica celular, la generación de ERO y la eficiencia de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, los resultados son muchas veces contradictorios, dependiendo de factores como la intensidad del campo, el tiempo de exposición, el tipo celular y la metodología utilizada.

Particularmente, se desconoce si los efectos de los campos magnéticos sobre la función mitocondrial son directos (sobre el organelo) o mediados por mecanismos celulares integrados. Además, hay escasa información que compare estos efectos en sistemas celulares completos y en mitocondrias aisladas, lo cual es crucial para delimitar el origen de las alteraciones bioenergéticas observadas.

Dado este contexto, surge la necesidad de investigar cómo la exposición a campos magnéticos de diferentes intensidades y tiempos afecta la función mitocondrial, evaluada a través de la producción de ATP y el consumo de oxígeno. Comprender estas respuestas en modelos como células C2C12 y mitocondrias de hígado de rata puede aportar evidencia útil tanto para el campo de la bioenergética como para la bioquímica y biofísica aplicada, además de contribuir a una mejor evaluación de los posibles riesgos o beneficios asociados a estos campos.

El objetivo principal de este proyecto fue analizar si campos magnéticos estáticos de 150, 300 y 450 mT, aplicados durante distintos tiempos de exposición (15, 30, 45 y 60

minutos), podían afectar parámetros bioenergéticos como la producción de ATP y el consumo de oxígeno en células C2C12 y en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Con los resultados obtenidos, se espera abrir una línea de investigación que profundice en las implicaciones de los campos magnéticos para la biofísica celular, la ecología, la toxicología ambiental o la medicina.

Basándonos en la información anteriormente expuesta, se sintetiza que es posible que el campo magnético generado por el movimiento de cargas dentro de las mitocondrias, y a su vez dentro de las células en estudio, podría interactuar con un campo magnético externo, aun cuando se sabe que los campos magnéticos alteran el movimiento de cargas. De esta manera, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Puede un campo magnético externo alterar la función mitocondrial?

4. Hipótesis

Debido a sus componentes moleculares con propiedades magnéticas potenciales, las mitocondrias y las células, al ser expuestas a un campo magnético externo, presentarán alteraciones en la función mitocondrial, principalmente en la producción de ATP.

5. Objetivos

1.1 Objetivo General

Estudiar los efectos de campos magnéticos externos sobre la bioenergética mitocondrial y celular.

1.2 Objetivos Específicos

Implementar una metodología para determinar la influencia de campos magnéticos externos sobre sistemas biológicos celulares y subcelulares de producción de energía metabólica.

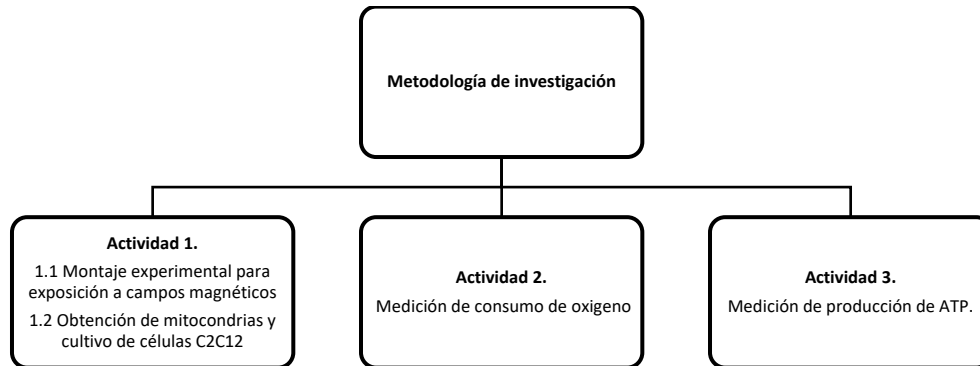
Evaluar el efecto de campos magnéticos externos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular muscular C2C12.

Evaluar el efecto de campos magnéticos externos sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular muscular C2C12.

6. Metodología

Para la fase experimental de este trabajo se plantearon tres actividades principales (Figura 2), cada una asociada respectivamente a los tres objetivos específicos del estudio. La Actividad 1 consistió en la construcción de un montaje experimental que permitiera la exposición de los sistemas biológicos a campos magnéticos estáticos, así como en la implementación de un protocolo necesario para la obtención de mitocondrias aisladas de hígado de rata y el cultivo de células C2C12. La Actividad 2 se enfocó en la medición del consumo de oxígeno en ambos sistemas biológicos y la evaluación del parámetro bioenergético ICR. La Actividad 3 correspondió a la determinación de la producción de ATP en mitocondrias aisladas y en células C2C12.

Figura 2.

Metodología del proyecto de investigación.

Se diseñó un experimento que consistió en la exposición de dos sistemas biológicos, mitocondrias aisladas de hígado de rata y células musculares C2C12, a campos magnéticos estáticos bajo diferentes condiciones de intensidad y tiempo de exposición.

Las mitocondrias aisladas se mantuvieron a una temperatura de 4 °C con el fin de preservar su integridad funcional durante los ensayos, mientras que las células C2C12 se incubaron a 37 °C, condiciones fisiológicas adecuadas para su mantenimiento (Nicholls & Ferguson, 2013). Para cada sistema biológico se estableció un grupo control sin exposición a campo magnético y grupos experimentales expuestos a tres intensidades de campo magnético estático (150, 300 y 450 mT). Adicionalmente, se evaluó el efecto del tiempo de exposición mediante cuatro intervalos experimentales (15, 30, 45 y 60 minutos). De esta manera, el diseño experimental adoptado correspondió a un diseño factorial, en el cual se analizaron de forma combinada tres factores principales: el tipo de sistema biológico (mitocondrias aisladas o células C2C12), la intensidad del campo magnético y el tiempo de exposición. Este enfoque permitió evaluar de manera comparativa la influencia de estas variables sobre los parámetros

bioenergéticos analizados, específicamente el consumo de oxígeno y la producción de ATP, en sistemas celulares y subcelulares. En la Tabla 1 se resume el diseño experimental.

Tabla 1.

Condiciones del diseño experimental

Sistema biológico	Temperatura experimental	Grupo	Intensidad del campo magnético (mT)	Tiempo de exposición (min)	Variables evaluadas
Mitocondrias aisladas de hígado de rata	4 °C	Control	0	15, 30, 45, 60	-Consumo de oxígeno -Producción de ATP
		Expuesto	150, 300, 450		
Células C2C12	37 °C	Control	0		
		Expuesto	150, 300, 450		

7.1 Actividad 1. Montaje experimental para la exposición a campos magnéticos, obtención de mitocondrias y cultivo de la línea celular C2C12 y desarrollo de una metodología para determinar la influencia de campos magnéticos sobre células y mitocondrias aisladas

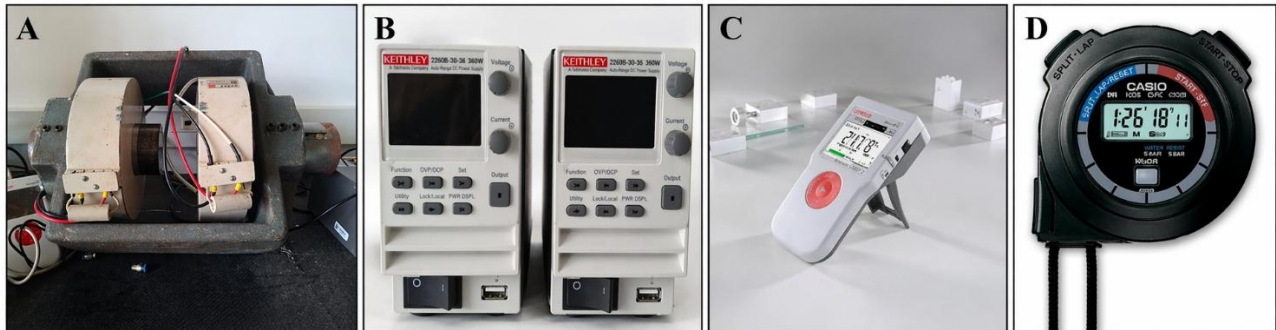
Esta actividad se dividió en dos etapas principales: La primera etapa consistió en la construcción de un montaje experimental destinado a la exposición de sistemas biológicos celulares y subcelulares involucrados en la producción de energía metabólica a diferentes intensidades de campo magnético estático y tiempos de exposición (Figura 3). Para ello, se empleó un electroimán marca Cenco (Central Scientific Company, Chicago, IL, EE. UU.), conformado por dos bobinas de cobre y un núcleo de hierro, donde se asegura el porta muestras y se concentra el campo magnético generado.

Las bobinas se conectaron a dos fuentes de poder marca Keithley, modelo 2260B-30-36 (Tektronix, Cleveland, OH, EE. UU.), utilizadas para la generación de campos magnéticos estáticos del valor nominal esperado, siguiendo una metodología similar a la descrita por Milovanovich et al. (Milovanovich et al. 2016). Asimismo, se incorporó un sistema de medición de campo magnético marca Leybold, modelo Mobile-CASSY 2 (Leybold GmbH, Colonia, Alemania), que permitió registrar la intensidad del campo durante los experimentos.

Se realizaron ensayos previos para verificar que, durante los tiempos de exposición, no se presentara una deriva significativa en la intensidad del campo magnético. Los tiempos de exposición se controlaron mediante un cronómetro digital marca Casio, modelo HS-3 (Casio Computer Co., Ltd., Tokio, Japón).

Figura 3.

Instrumentos para la generación de campos magnéticos estáticos en material biológico.



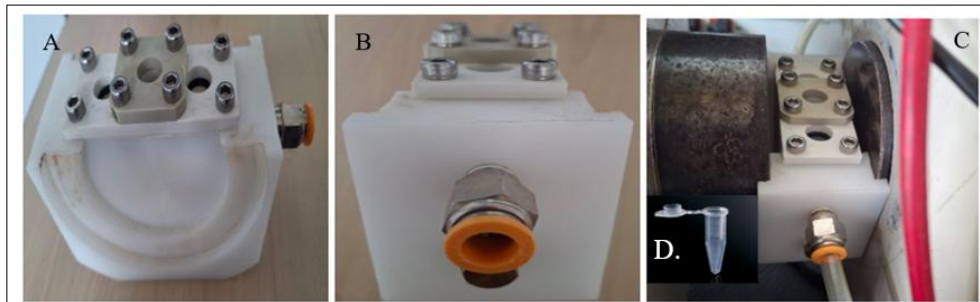
Nota. **A.** Electroimán. **B.** Fuentes de poder. **C.** Medidor de campo magnético. **D.** Cronómetro.

El montaje contempló el diseño de un portamuestras que se puede observar en la Figura 4. Este facilitó el posicionamiento adecuado de los sistemas de prueba biológicos dentro del campo magnético, garantizando una exposición homogénea. Este portamuestras fue diseñado y

construido en teflón con tres compartimentos para el posicionamiento de dos tubos tipo Eppendorf.

Figura 4.

Portamuestra de tres compartimentos fabricado en teflón,



Nota. **A.** Vista lateral, **B.** Vista frontal. **C.** Portamuestra ubicado en el electroimán, **D.** Tubo tipo Eppendorf.

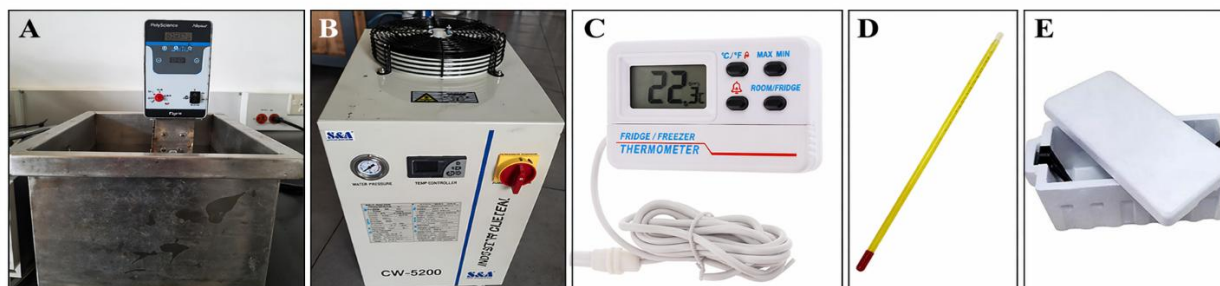
Adicionalmente, se aseguró que la temperatura se mantuviera constante durante todo el periodo de exposición. Para el monitoreo del sistema, se establecieron puntos de medición utilizando una termocupla digital marca Fridge Freezer Thermometer (Fridge Freezer Thermometer, China). La temperatura se mantuvo a 4 °C para las mitocondrias mediante un chiller industrial marca S&A (S&A Teyu Electromechanical Co., Guangzhou, China), y a 37 °C para las células en cultivo, utilizando un baño termostataado de laboratorio marca Cole-Parmer, modelo Polystat (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, EE. UU.).

Las mitocondrias del grupo control, depositadas en tubos tipo Eppendorf, se mantuvieron en una cava de icopor con hielo seco a 4 °C, con monitoreo de temperatura mediante un termómetro de bulbo de mercurio. Por su parte, las células del grupo control se mantuvieron en tubos tipo

Eppendorf dentro del baño termostataado a 37 °C, el cual además alimentaba el sistema mediante circulación de agua a esta temperatura a través de mangueras y conexiones

Figura 5.

Sistema de control de temperatura.



Nota. **A.** Baño termostataado, **B.** *Chiller* industrial, **C.** Termocupla. **D.** Termómetro de bulbo de mercurio, **E.** Cava de icopor.

Luego de tener el montaje funcional experimental se procedió a implementar las metodologías para el aislamiento de mitocondrias de hígado de rata y el cultivo de células C2C12 con base en los procedimientos que se describen a continuación.

7.1.1 Aislamiento de mitocondrias de hígado de rata

Para este trabajo, se utilizaron mitocondrias aisladas de ratas Wistar macho de 8 a 10 semanas de edad, con un peso aproximado de 160 ± 10 g. Los animales fueron alojados en el Bioterio de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, ubicado en el Parque Tecnológico Guatiguará. Este bioterio corresponde a un sistema convencional con nivel de bioseguridad 2 y es gestionado bajo los lineamientos establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Council, 2011).

Este protocolo fue avalado por el Comité de Ética en Investigación Científica (CEINCI) de la Universidad Industrial de Santander, de acuerdo con acta número 4110 del 14 de junio de 2024. Se llevaron a cabo 4 experimentos independientes en cada parte metodológica, de modo que se usaron 8 ratas en total. Las ratas no recibieron ningún tratamiento, ya que las mitocondrias que se usaron debían tener un funcionamiento normal. Para el mantenimiento de los animales se tuvieron condiciones de temperatura entre 20 y 26 °C, ciclos normales de luz-oscuridad de 12 horas, buena ventilación y calidad de aire, espacio a razón de 187 cm² por animal y agua y comida *ad libitum*, entre otras.

Las mitocondrias se aislaron mediante un protocolo similar al descrito por Pallotti y Lenaz (Pallotti & Lenaz, 2007). Después de eutanasiados los animales, se les remueve el hígado y, sobre hielo, se pica el tejido con tijeras y se lava con un amortiguador que contiene manitol, sacarosa, EDTA y albúmina sérica bovina (ASB), entre otros, con el objeto de remover sangre y tejido conectivo.

El tejido picado y lavado se suspende en amortiguador limpio y se adiciona a un homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem con pistilo de teflón, ambos pre-enfriados. Después de homogenizar, la mezcla se filtra para eliminar restos mayores y el homogenizado se centrifuga a 600 g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se recupera y el botón se resuspende en amortiguador para una segunda centrifugación a 7000 g a 4 °C por 10 min. Se debe remover con una servilleta limpia el exceso de grasa extra en el recipiente.

El botón resultante se lava con amortiguador y se centrifuga a 6000 g por 10 min. El botón resultante ahora se resuspende en un amortiguador como el anterior, pero sin ASB y se centrifuga nuevamente a 6000 g por 10 min. Finalmente, el botón resultante se resuspende en este último amortiguador y se determina el contenido de proteína mediante el método de Bradford.

Una vez aisladas las mitocondrias, se evaluó su viabilidad funcional mediante la medición del consumo de oxígeno utilizando un sistema de respirometría. Este procedimiento permitió determinar la capacidad respiratoria de las preparaciones mitocondriales y verificar su estado funcional antes de realizar los experimentos de exposición a campos magnéticos.

Como criterio de calidad mitocondrial, se determinó el Índice de Control Respiratorio (ICR), definido como la relación entre la respiración en estado 3 (respiración estimulada por ADP) y la respiración en estado 4 (respiración basal posterior a la fosforilación del ADP). Este índice es ampliamente utilizado como indicador del grado de acoplamiento entre la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa (Nicholls & Ferguson, 2013). Las preparaciones mitocondriales se consideraron funcionalmente viables cuando el valor del Índice de Control Respiratorio (ICR) fue superior a 3,0. Valores inferiores a este umbral sugieren alteraciones en la integridad mitocondrial o una disminución en la eficiencia del acoplamiento respiratorio (Nicholls & Ferguson, 2013; Brand & Nicholls, 2011) por lo tanto, aquellas muestras que presentaron valores por debajo de este criterio fueron descartadas y no se utilizaron en los experimentos posteriores. Este parámetro también se utilizó como parámetro para evaluar el comportamiento de los sistemas expuestos frente al grupo control.

7.1.2 Cultivo de células C2C12

Las células C2C12 se cultivaron en medio DMEM suplementado con glutamina 2 mM y suero fetal bovino al 10%. Las células pueden presentar un crecimiento relativamente lento al ser reanimadas tras congelación, tardando de 4 a 5 días en alcanzar el 50 % de confluencia con una siembra de 2 x 1000 células/cm². Los cultivos semi-confluentes (50-70 %) se dividieron en una proporción de 1:3 a 1:6, despegando con tripsina/EDTA, sembrando a 1-2 x 1000 células/cm² e incubando con 5 % de CO₂ a 37 °C (Jang et al., 2022).

Para los ensayos de consumo de oxígeno mediante respirometría en el sistema Oroboros O2k, se utilizaron 2 × 10⁶ células por celda, de acuerdo con protocolos estandarizados para mediciones de alta resolución (Gnaiger, 2020). Se consideraron células funcionalmente viables para la medición aquellas que presentaron un valor de ICR superior a 3.0 (Nicholls, 2011).

7.2 Actividad 2. Evaluación del efecto de campos magnéticos externos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata y cultivo de células C2C12.

Las mediciones de consumo de oxígeno se realizaron mediante respirometría de alta resolución utilizando el equipo Oxygraph-2k (Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Austria), ubicado en el Laboratorio 402 del grupo de investigación GIBIM. Este sistema permite determinar con alta precisión la tasa de consumo de oxígeno en muestras biológicas mediante sensores polarográficos de oxígeno disuelto, lo que posibilita evaluar la actividad respiratoria mitocondrial en tiempo real (Pesta & Gnaiger, 2012).

La respiración mitocondrial se evaluó a través de la vía dependiente del complejo I, utilizando glutamato de sodio como sustrato para alimentar la cadena de transporte de electrones. Durante los ensayos se determinaron los estados respiratorios mitocondriales estado 3 y estado 4. El estado 3 corresponde a la respiración estimulada por la adición de ADP (200 μ M), condición en la cual la cadena de transporte de electrones presenta alta actividad y la fosforilación oxidativa ocurre de manera eficiente, promoviendo la síntesis de ATP. Por su parte, el estado 4 representa la respiración basal posterior al agotamiento del ADP disponible, donde la tasa respiratoria disminuye y refleja principalmente la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna al paso de protones (Barrientos et al., 2009).

El Índice de Control Respiratorio (ICR) se calculó como la relación entre las tasas de respiración correspondientes al estado 3 y al estado 4, determinadas a partir de la pendiente de consumo de oxígeno registrada en cada estado respiratorio (Martínez-Abundis et al., 2010).

Los datos obtenidos se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína mitocondrial o al número de células utilizadas en cada ensayo. Para los experimentos con mitocondrias, se emplearon preparaciones previamente aisladas y expuestas a campos magnéticos de acuerdo con el diseño experimental. En cada cámara del oxígrafo se utilizó una concentración de proteína mitocondrial de 1 mg/mL, suspendida en un medio de respiración compuesto por manitol 125 mM, EGTA 0,1 mM, HEPES 10 mM y KCl 65 mM, ajustado a pH 7,4. Las mitocondrias se incubaron a 37 °C con agitación constante, y se adicionaron glutamato, ADP y fosfato inorgánico (Pi) para estimular la respiración mitocondrial a través de la vía dependiente del complejo I (Nicholls & Ferguson, 2013).

Para los análisis en células C2C12, las células previamente expuestas a campos magnéticos se desprendieron mediante tratamiento con tripsina/EDTA y posteriormente se adicionaron a las cámaras del oxígrafo a una densidad de 2×10^6 células por cámara, en medio de respiración y a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se añadió digitonina para permeabilizar las células y permitir el acceso de los sustratos a las mitocondrias (Kuznetsov et al., 2008). Finalmente, se adicionaron glutamato, ADP y fosfato inorgánico (Pi) para inducir la actividad respiratoria mitocondrial y evaluar el consumo de oxígeno.

A partir de las mediciones obtenidas, se determinaron las tasas de consumo de oxígeno correspondientes a los estados 3 y 4, y con estos valores se calculó el ICR como la relación entre ambos estados respiratorios.

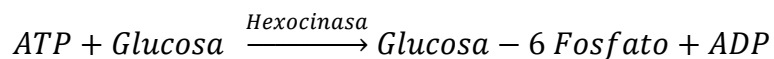
Debido a la variabilidad biológica inherente a este tipo de ensayos, los resultados se normalizaron tomando el valor del ICR de cada tratamiento y dividiéndolo entre el valor correspondiente al control. De esta manera, el grupo control se estableció como valor de referencia igual a 1, mientras que los valores de los grupos experimentales se expresaron en relación con este, permitiendo comparar la respuesta de cada tratamiento.

Finalmente, los resultados de producción de ATP se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software LLC, San Diego, CA, EE. UU.). Para cada intensidad de campo magnético y tiempo de exposición, los valores obtenidos se compararon con el grupo control mediante una prueba t pareada de dos colas. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$ en comparación con el grupo control (CT).

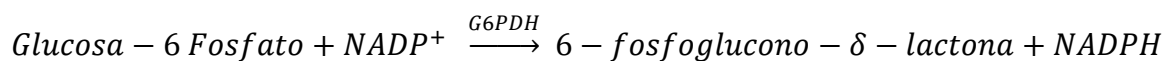
7.3 Actividad 3. Evaluación del efecto de campos magnéticos externos sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata y la línea celular C2C12.

La determinación de ATP se realizó mediante un método enzimático acoplado, el cual constituye una medida indirecta, en el protocolo se implementa la medición de la concentración de NADH presente en el sistema a analizar, cuya señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de ATP (Radnai L,2019).

El método acoplado consiste en dos reacciones en una primera, el ATP es utilizado por la enzima hexoquinasa para fosforilar la glucosa y formar glucosa-6-fosfato (Ecuación 2). Posteriormente, la glucosa-6-fosfato generada es oxidada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), produciendo NADPH a partir de NADP⁺ (Ecuación 3), La formación de NADPH genera un incremento en la señal de fluorescencia medido a 340/350 nm, el cual es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra. De esta manera, el aumento en la fluorescencia registrado durante el ensayo permite estimar indirectamente la producción de ATP en los sistemas biológicos evaluados (Fernández-Rojas et al. 2015).



(Ecuación 2)

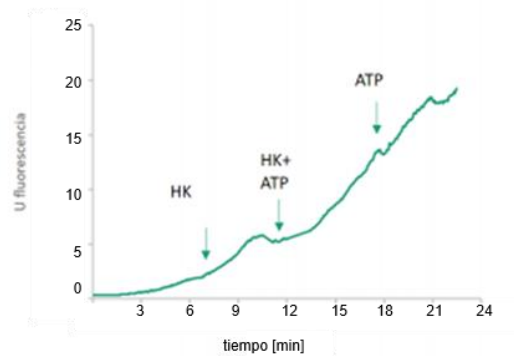


(Ecuación 3)

Las mediciones se realizaron utilizando el lector de microplacas multimodal Varioskan™ LUX (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Para la implementación del método, se prepararon soluciones con concentraciones conocidas de ATP con el fin de establecer una curva de calibración que relacionara la señal de fluorescencia con la cantidad de ATP presente en las muestras problema. La Figura 6 muestra los incrementos de fluorescencia en función del tiempo tras la adición de ATP al medio de reacción, lo cual confirma que la metodología empleada permite monitorear de manera eficiente la síntesis de ATP en los sistemas biológicos evaluados.

Figura 6.

Cinética de reacción enzimática de producción de ATP.



Nota. HK: hexocinasa

Una vez verificado que los cambios en fluorescencia corresponden a la cantidad de ATP presente en el medio de reacción de cada pozo, se procedió a realizar los ensayos con mitocondrias aisladas de hígado de rata y con células C2C12.

Para las mediciones en mitocondrias, se emplearon preparaciones previamente aisladas y expuestas a campo magnético de acuerdo con el diseño experimental, con un contenido de proteína

mitocondrial de 25 mg/mL. En cada pozo de la microplaca se adicionaron 250 μ L de buffer de reacción, 1 μ L de glucosa (1 M), 1 μ L de NADP⁺ (1 M), 2,1 μ L de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 25 μ L de suspensión mitocondrial (equivalente a 10 mg/mL de proteína) y 20 μ L de hexoquinasa (0,5 U). Este sistema enzimático acoplado permite cuantificar la producción de ATP mediante la conversión de NADP⁺ a NADPH, lo cual puede ser detectado por fluorescencia (Kuznetsov et al., 2008).

Los resultados de fluorescencia se normalizaron tomando la diferencia de las unidades relativas de fluorescencia (URF) del punto final de la reacción menos el inicial de cada tratamiento y dividiéndolo entre el valor correspondiente al grupo control. De esta manera, el grupo control se estableció como valor de referencia igual a 1, mientras que los valores obtenidos para los grupos tratados se expresaron en relación con este, permitiendo observar la tendencia de cada tratamiento respecto al control.

Los resultados de producción de ATP se expresaron como el promedio \pm EEM. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism. Para cada intensidad de campo magnético y tiempo de exposición, los valores obtenidos se compararon con el grupo control mediante una prueba t pareada de dos colas. Se consideraron significativos los valores de $P < 0.05$ vs. CT.

8. Resultados

8.1 Construcción del montaje experimental para desarrollo de una metodología para determinar la influencia de campos magnéticos sobre células y mitocondrias aisladas.

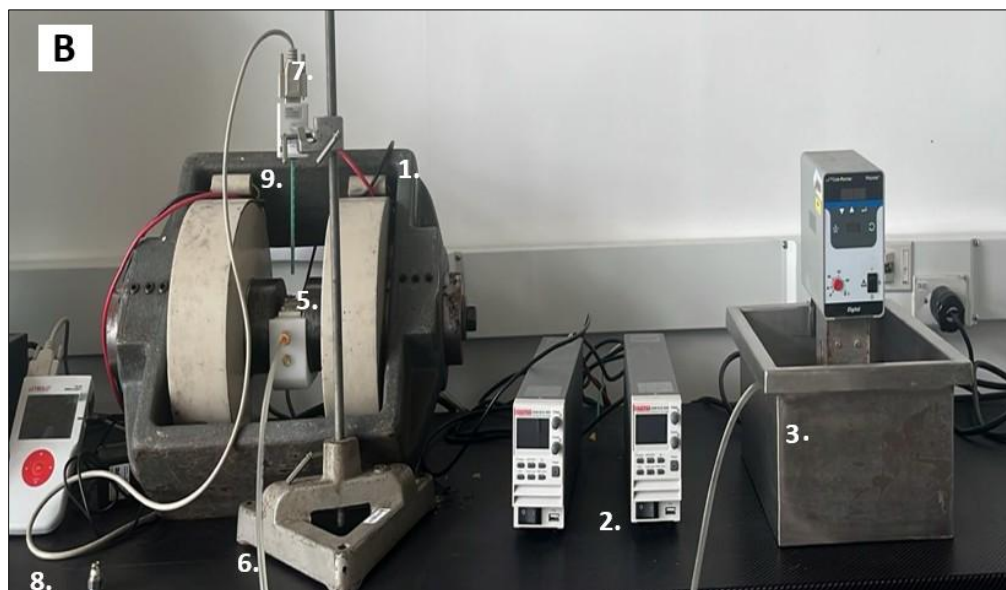
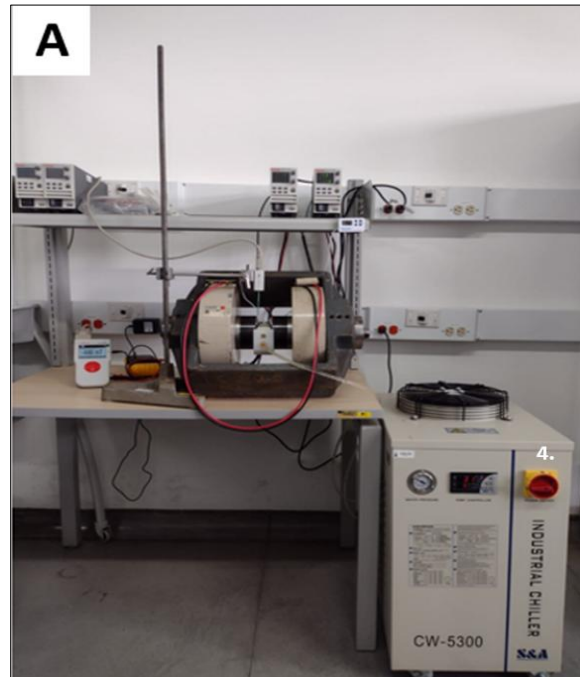
El montaje experimental obtenido permitió aplicar y comprobar los valores nominales requeridos de los campos magnéticos (150, 300 y 450 mT), así como mantener condiciones controladas de temperatura (4 °C para mitocondrias, 37 °C para células) y tiempos de exposición (15, 30, 45 y 60 minutos), garantizando una exposición precisa y reproducible en cada uno de los tratamientos.

Como se muestra en conjunto en la Figura 7, este montaje está compuesto por un generador de campo magnético que consta de un electroimán (1) con núcleo de hierro alimentado de dos fuentes de voltaje (2), un baño termostatado (3, para células), chiller (4, para mitocondrias), un porta-muestra (5) hecho en teflón conectado al baño por medio de un sistema de recirculación (6) para mantener la temperatura de los sistemas biológicos, un cronómetro (7), un medidor de campo magnético (8) y una termocupla (9).

Se aplicó el procedimiento para aislamiento de mitocondrias de hígado de rata (Sección 6.1.1), obteniéndose mitocondrias funcionales con un ICR por encima de 3.0. El cultivo de células C2C12 alcanzó una confluencia de aproximadamente 95% (Figura 8), suficiente para obtener el número necesario de células para los ensayos (2×10^6 células/experimento).

Figura 7.

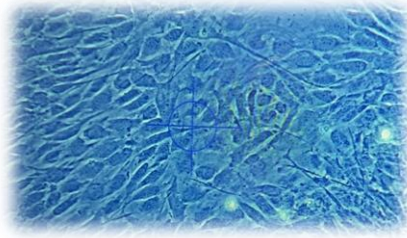
Configuración experimental para la exposición de mitocondrias y células a campos magnéticos.



Nota. **A.** Montaje para células. **B.** Montaje para mitocondrias aisladas. **1.** electroimán con núcleo de hierro, **2.** fuentes de voltaje, **3.** baño termostátado (36°C), **4.** Chiller (4°C), **5.** porta-muestra, **6.** sistema de recirculación (mangueras y conectores metálicos), **7.** cronómetro, **8.** medidor de campo magnético, **9.** Termocupla.

Figura 8.

Cultivo de la línea celular C2C12 con aproximadamente 95% de confluencia.



Nota. Magnificación 20X.

8.2 Medición del efecto de campos magnéticos externos sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata y células musculares C2C12.

8.2.1 Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado de rata

En las Tablas 2, 3 y 4 se presentan los datos obtenidos del consumo de oxígeno de los estados respiratorios 3 y 4 con el cálculo del ICR para mitocondrias de hígado de rata expuestas a campos magnéticos estáticos de 150, 300 y 450 mT.

Tabla 2.

Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para mitocondrias expuestas a campo magnético de 150 mT.

150mT										
Tiempo [min]	Mitocondrias control				Mitocondrias expuestas a campo magnético					
	Estado 3 [pmol O₂]	Estado 4 [pmol O₂]	ICR	ICR normalizado	Estado 3 [pmol O₂]	Estado 4 [pmol O₂]	ICR	ICR normalizado	prom	DE
15	211,64	41,02	5,16	1	281,67	48,36	5,82	1,13	0,91	0,22
	262,53	45,94	5,71	1	222,85	43,22	5,16	0,9		
	236,78	68,15	3,47	1	142,87	58,49	2,44	0,7		
30	182,85	35,71	5,12	1	195,97	67,95	2,88	0,56	0,69	0,13

	215,49	59,94	3,59	1	185,86	63,66	2,92	0,81		
	235,01	67,15	3,5	1	144,94	59,18	2,45	0,7		
45	262,53	47,94	5,48	1	202,92	50,29	4,03	0,74	0,58	0,14
	183,6	35,18	5,22	1	118,85	41,03	2,9	0,55		
	210,55	65,87	3,2	1	25,24	17,03	1,48	0,46		
60	260,53	40,94	6,36	1	256,92	50,15	5,12	0,81	0,78	0,03
	262,53	47,78	5,49	1	188,86	44,56	4,24	0,77		
	215,49	59,94	3,59	1	166,55	62,02	2,69	0,75		

Nota: ICR: índice de control respiratorio, prom: promedio, DE: desviación estándar

Tabla 3.

Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para mitocondrias expuestas a campo magnético de 300 mT.

300 mT										
tiempo [min]	Mitocondrias control				Mitocondrias expuestas a campo magnético					
	Estado 3 [pmol O ₂]	Estado 4 [pmol O ₂]	ICR	ICR normalizado	Estado 3 [pmol O ₂]	Estado 4 [pmol O ₂]	ICR	ICR normalizado	prom	DE
15	154,25	61,7	2,5	1	179,31	78,82	2,27	0,91	0,95	0,046
	226,77	52,1	4,35	1	217,86	53,26	4,09	0,94		
	225,48	67,57	3,34	1	225,48	67,57	3,34	1,00		
30	224,41	69,07	3,25	1	206,66	125,98	1,64	0,5	0,87	0,486
	244,07	56,4	3,04	1	242,7	79,89	4,33	1,42		
	245,88	57,98	4,24	1	241,77	82,49	2,93	0,69		
45	224,41	69,07	3,25	1	189,89	57,64	3,29	1,01	0,95	0,079
	244,07	56,4	4,33	1	247,5	58,49	4,23	0,98		
	134,35	35,5	3,78	1	107,31	33,08	3,24	0,86		
60	224,41	69,07	3,25	1	299,61	74,77	4,01	1,23	0,93	0,265
	244,07	56,4	4,33	1	211,14	66,75	3,16	0,73		
	174,39	41,33	4,22	1	146,91	41,93	3,5	0,83		

Nota: ICR: índice de control respiratorio, prom: promedio, DE: desviación estándar

Tabla 4.

Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para mitocondrias expuestas a campo magnético de 450 mT.

450 mT						
tiempo [min]	Mitocondrias control			Mitocondrias expuestas a campo magnético		
	ICR			ICR		
					prom	DE

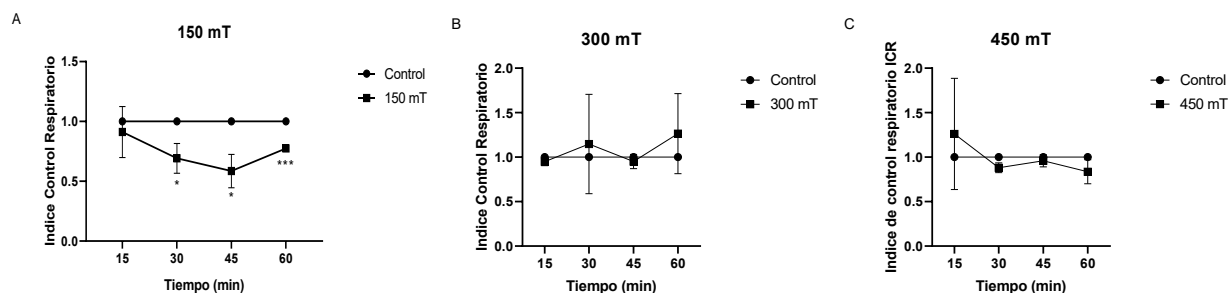
	Estado 3 [pmol O2]	Estado 4 [pmol O2]	ICR normalizado	Estado 3 [pmol O2]	Estado 4 [pmol O2]	ICR normalizado					
15	156,29	29,9	5,23	1	72,67	21,01	3,46	0,66	1,26	0,626	
	113,77	69,33	1,64		96,19	30,65	3,14				1,91
	127,49	58,83	2,17		122,05	46,69	2,61				1,21
30	137,68	31,64	4,35	1	143,65	37,27	3,85	0,89	0,88	0,056	
	130,11	40,72	3,2		120,35	40,61	2,96				0,93
	247,49	95,79	2,58		164,45	77,16	2,13				0,82
45	161,79	57,9	2,79	1	128,38	49,61	2,59	0,93	0,96	0,070	
	125,66	42,17	2,98		124,66	46	2,71				0,91
	247,49	95,79	2,58		15,12	5,6	2,7				1,04
60	145,88	60,78	2,4	1	225,96	97,4	2,32	0,97	0,84	0,135	
	182,94	59,92	3,05		210,85	82,18	2,57				0,84
	165,85	49,92	3,32		105,36	45,28	2,33				0,7

Nota: ICR: índice de control respiratorio, prom: promedio, DE: desviación estándar

En la Figura 9 se muestran los efectos de la exposición de mitocondrias aisladas de hígado de rata a los campos magnéticos sobre el ICR.

Figura 9.

Efecto de campos magnéticos estáticos sobre el ICR de mitocondrias aisladas de hígado de rata.



Nota. **A.** 150 mT. **B.** 300 mT **C.** 450mT. Todos los valores de ICR se normalizaron con respecto al ICR de las mitocondrias no expuestas (CT). n = 3-5. Promedio ± EEM en las ordenadas. En cada tiempo de exposición se comparó con su respectivo CT con una prueba t pareada de dos colas. *P<0.05, ***P<0.001 vs. CT.

tiempo [min]	[pmol O2]	[pmol O2]		Normalizado	[pmol O2]	[pmol O2]		Normalizado	prom	
15	179,45	28,98	6,19	1	114,52	25,47	4,5	0,73	0,68	0,151
					149,96	30,25	4,96	0,8		
					170,87	54,02	3,16	0,51		
30	157,58	13,21	11,93	1	184,25	32,98	5,59	0,47	0,44	0,030
					201,96	38,47	5,25	0,44		
					179,25	36,48	4,91	0,41		
45	198,46	15,78	12,58	1	187,24	33,25	5,63	0,45	0,33	0,104
					159,58	50,26	3,18	0,25		
					149,91	39,25	3,82	0,3		
60	209,47	65,28	3,21	1	198,58	49,45	4,02	1,25	1,365	0,163
					184,69	38,95	4,74	1,48		

Nota: ICR: índice de control respiratorio, prom: promedio, DE: desviación estándar

Tabla 6.

Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para las células C2C12 expuestas a campo magnético de 300 mT.

300 mT										
tiempo [min]	Células Control				Células expuestas a campo magnético					
	Estado 3	Estado 4	ICR	ICR	Estado 3	Estado 4	ICR	ICR	prom	DE
	[pmol O2]	[pmol O2]		Normalizado	[pmol O2]	[pmol O2]		Normalizado		
15	520,3	19,15	27,17	1	330,4	105,63	3,13	0,12	0,19	0,136
					331,2	110,71	2,99	0,11		
					158,54	16,82	9,43	0,35		
30	163,12	69,52	2,35	1	244,15	57,94	4,21	1,8	1,86	0,548
					268,98	46,89	5,74	2,44		
					125,52	39,48	3,18	1,35		

45	299,87	125,68	2,39	1	369,52	134,81	2,7	1,15	1,74	0,71
							4			
					224,84	61,25	3,6	1,54		
					171,64	28,41	6,0	2,53		
							4			
60	250,36	28,54	8,77	1	198,54	45,61	4,3	0,5	0,45	0,07
							5			
					335,69	96,84	3,4	0,4		
							7			

Nota: ICR: índice de control respiratorio, prom: promedio, DE: desviación estándar

Tabla 7.

Consumo de oxígeno e índice de control respiratorio para las células C2C12 expuestas a campo magnético de 450 mT.

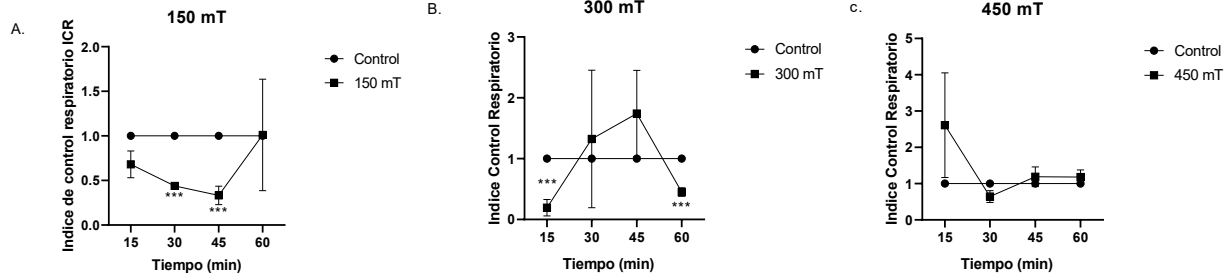
450 mT										
tiempo [min]	Células Control				Células expuestas a campo magnético					
	Estado 3	Estado 4	ICR	ICR	Estado 3	Estado 4	ICR	ICR	prom	DE
	[pmol O ₂]	[pmol O ₂]		Normalizado	[pmol O ₂]	[pmol O ₂]		Normalizado		
15	130,24	29,54	4,4	1	154,69	26,52	5,83	1,32	2,61	1,44
					201,65	19,52	10,3	2,34		
					269,45	14,65	18,3	4,17		
							9			
30	108,45	15,69	6,9	1	197,54	34,58	5,71	0,83	0,64	0,16
					157,65	40,18	3,92	0,57		
					187,45	51,26	3,66	0,53		
45	169,45	73,25	2,3	1	154,97	76,54	2,02	0,88	1,19	0,27
					142,85	47,65	3	1,3		
					136,24	42,36	3,22	1,39		
60	258,46	68,69	3,7	1	345,92	69,54	4,97	1,32	1,18	0,19
					297,35	76,21	3,9	1,04		
			6							8

Nota: ICR: índice de control respiratorio, prom: promedio, DE: desviación estándar

En la Figura 10, se muestran graficados y analizados los resultados de la exposición de células musculares C2C12 a los campos magnéticos sobre el ICR.

Figura 10.

Efecto de campos magnéticos estáticos sobre el ICR de células C2C12.



Nota. **A.** 150 mT. **B.** 300 mT. **C.** 450mT. Todos los valores de ICR se normalizaron con respecto al ICR de las células no expuestas (CT). $n = 3-5$. Promedio \pm EEM en las ordenadas. En cada tiempo de exposición se comparó con su respectivo CT con una prueba t pareada de dos colas. *** $P < 0.001$ vs. CT.

En células C2C12, el ICR mostró variaciones dependientes de la intensidad del campo magnético y del tiempo de exposición. A 150 mT, se observó una disminución significativa del ICR del 54% y 67% con respecto al control a los 30 y 45 minutos de exposición, respectivamente. A 300 mT, se observó un comportamiento similar ya que el ICR en los tiempos extremos 15 y 60 minutos disminuyó 81% y 45%, con respecto al control, respectivamente. Por su parte, a 450 mT no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos evaluados. En conjunto, estos resultados evidencian una respuesta dependiente del tiempo y de la intensidad del campo magnético, con efectos significativos a 150 mT y 300 mT, pero no a 450 mT bajo las condiciones experimentales evaluadas.

8.3 Evaluación del efecto de campos magnéticos externos sobre la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata y células musculares C2C12.

8.3.1. Medición de la producción de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata

En las Tablas 8, 9 y 10 se presentan los valores de fluorescencia obtenidos para la producción de ATP en mitocondrias expuestas a campos magnéticos de 150, 300 y 450 mT. Los valores fueron posteriormente normalizados con respecto a sus respectivos controles.

Tabla 8.

Intensidad de fluorescencia asociada a la producción de ATP en mitocondrias expuestas a un campo magnético de 150 mT

	150 mT											
	Control		15 min		Control		30 min		Control		45 min	
Inicio de Reacción (URF)	0,2155	0,2492	0,3492	0,3992	0,2135	0,2122	0,2242	0,2652	0,2034	0,2499	0,2568	0,2234
Fin de Reacción (URF)	0,5155	0,5169	0,5169	0,6469	0,4326	0,5722	0,4542	0,5862	0,4532	0,5419	0,5568	0,5234
Diferencia (URF)	0,3000	0,2677	0,1677	0,2477	0,2191	0,3600	0,2300	0,3210	0,2498	0,2920	0,3000	0,3000
Normalizado con respecto al control	1,0000	0,8923	0,6264	1,4770	1,0000	1,6431	0,6389	1,3957	1,0000	1,1689	1,0274	1,0000

Nota: URF: Unidades relativas de fluorescencia

Tabla 9.

Intensidad de fluorescencia asociada a la producción de ATP en mitocondrias expuestas a un campo magnético de 300 mT

	300 mT											
	Control		15 min		Control		30 min		45 min			
Inicio de Reacción (URF)	0,2503	0,2731	0,2694	0,2491	0,2874	0,2672	0,2232	0,1877	0,2657	0,2217	0,2744	0,3044
Fin de Reacción (URF)	0,2939	0,3058	0,2941	0,2718	0,4530	0,2722	0,3407	0,2717	0,2940	0,3317	0,4944	0,5174
Diferencia (URF)	0,0436	0,0327	0,0247	0,0227	0,1656	0,0050	0,1175	0,0840	0,0283	0,1100	0,2200	0,2130
Normalizado	1,0000	0,7500	0,7554	0,9190	1,0000	0,0302	23,5000	0,7149	1,0000	3,8869	2,0000	0,9682

Nota: URF: Unidades relativas de fluorescencia

Tabla 10.

Intensidad de fluorescencia asociada a la producción de ATP en mitocondrias expuestas a un campo magnético de 450 mT

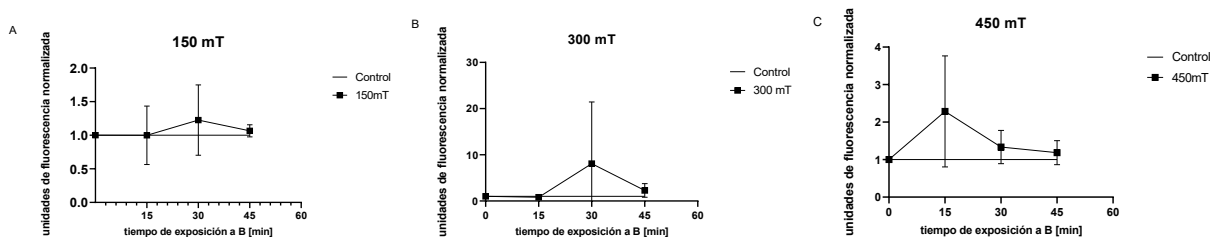
	450 mT											
	Control		15 min		Control		30 min		Control		45 min	
Inicio de RX (URF)	0,2744	0,2844	0,2706	0,2506	0,2431	0,2736	0,2836	0,2427	0,2341	0,2550	0,2450	0,2130
Fin de RX (URF)	0,4944	0,5174	0,5374	0,3051	0,2897	0,3281	0,3381	0,3427	0,2984	0,3550	0,3450	0,3130
Diferencia (URF)	0,2200	0,2330	0,2668	0,0545	0,0466	0,0545	0,0545	0,1000	0,0643	0,1000	0,1000	0,1000
Normalizado	1,0000	1,0591	1,1451	0,2041	1,0000	1,1687	1,0000	1,8362	1,0000	1,5552	1,0000	1,0000

Nota: URF: Unidades relativas de fluorescencia

En la Figura 11 se graficaron los valores de producción de ATP normalizados con respecto al control (CT).

Figura 11.

Efecto de campos magnéticos estáticos sobre la generación de ATP en mitocondrias aisladas de hígado de rata



A. 150 mT. B. 300 mT C. 450mT. Todos los valores de fluorescencia se normalizaron con respecto a las mitocondrias no expuestas (CT). n = 3-5. Promedio \pm EEM en las ordenadas. En cada tiempo de exposición se comparó con su respectivo CT con una prueba t pareada de dos colas.

En la Figura 11 se observa que la exposición a campos magnéticos de 150, 300 y 450 mT no tuvo ningún efecto sobre la producción de ATP a las condiciones establecidas

8.3.2 Medición de la producción de ATP células musculares C2C12

En la tabla 11, 12 y 13 se presentan los datos obtenidos para la producción de ATP en células C2C12 expuestas a campos magnéticos estáticos de 150, 300 y 450 mT, incluyendo los valores normalizados con respecto a los controles correspondientes.

Tabla 11.

Intensidad de fluorescencia debido a la producción de ATP en células C2C12 expuestas a un campo magnético de 150 mT

	control		15 min		control		30 min		control		45min	
Inicio de Reacción (URF)	14,753	17,584	17,936	18,209	15,876	19,753	27,65	11,83	9,83	21,05	20,753	20,553
Fin de Reacción (URF)	17,751	26,001	25,234	25,72	18,874	22,751	32,751	11,751	10,351	24,051	23,751	23,551
Diferencia (URF)	2,998	8,417	7,298	7,511	2,998	2,998	5,098	0,080	0,520	2,998	2,998	2,998
Normalizado	1,000	2,808	2,434	2,505	1,000	1,000	1,700	0,027	0,765	1,000	5,765	5,765

Nota: URF: Unidades relativas de fluorescencia

Tabla 12.

Intensidad de fluorescencia debido a la producción de ATP en células C2C12 expuestas a un campo magnético de 300 mT

	contro l		15 min		contro l		30 min		contro l		45min	
Inicio de Reacción (URF)	15,831	17,85 3	14,65 3	20,85 3	10,683	12,63 3	14,65 3	16,7 5	7,883	10,55 3	11,35 3	18,50 8
Fin de Reacción (URF)	12,251	20,85 1	17,65 1	23,85 1	13,603	13,65 1	15,65 1	17,7 5	7,803	10,46 3	11,27 3	21,85 1
Diferencia (URF)	3,580	2,998	2,998	2,998	2,920	1,018	0,998	0,99 8	0,080	0,090	0,080	3,343
Normalizado	1,000	0,837	0,837	0,837	1,000	0,349	0,342	0,34 2	1,000	1,125	1,000	41,78 8

Nota: URF: Unidades relativas de fluorescencia

Tabla 13.

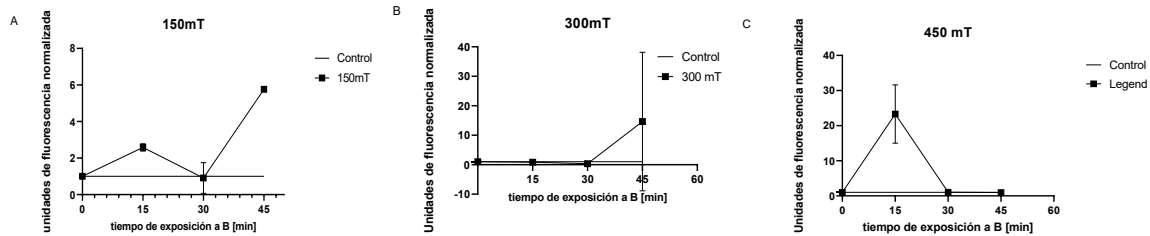
Intensidad de fluorescencia debido a la producción de ATP en células C2C12 expuestas a un campo magnético de 450 mT

	control		15 min		contro		30 min		contro		45min	
Inicio de Reacción (URF)	10,553	12,39 3	11,64 5	12,34 5	12,375	12,69 6	12,43 1	12,43 3	14,34	13,43	13,10 5	13,44 5
Fin de Reacción (URF)	10,473	13,49 3	13,89 3	14,59 3	14,349	14,99 6	14,34 6	14,35 8	16,36	15,37	15,09 8	15,35 7
Diferencia (URF)	0,080	1,100	2,248	2,248	1,974	2,300	1,915	1,925	2,016	1,935	1,993	1,912
Normalizado	1,000	13,75 0	28,10 0	28,10 0	1,000	1,165	0,970	0,975	1,000	0,960	0,989	0,948

Nota: URF: Unidades relativas de fluorescencia

Figura 12.

Efecto de campos magnéticos estáticos sobre la generación de ATP en células musculares C2C12



A. 150 mT. B. 300 mT C. 450mT. Todos los valores de fluorescencia se normalizaron con respecto a las células no expuestas (CT). n = 3-5. Promedio \pm EEM en las ordenadas. En cada tiempo de exposición se comparó con su respectivo CT con una prueba t pareada de dos colas.

Tal como se muestra en la Figura 12, la exposición de células C2C12 a campos magnéticos estáticos de 150, 300 y 450 mT no generó cambios significativos en la producción de ATP en los tiempos de exposición evaluados.

9. Discusión

Mediante el presente estudio se evaluaron los efectos de campos magnéticos estáticos sobre parámetros de la bioenergética mitocondrial usando el enfoque de la mitocondria aislada. Sólo se encontró un trabajo en la literatura científica en el cual se usa este mismo enfoque. Beutner y colaboradores (2025) observaron incrementos de hasta el 40% en el consumo de oxígeno en el estado 3 y en las actividades de los complejos III, IV y V de mitocondrias aisladas de corazón de rata expuestas a campos magnéticos estáticos entre 0.27 y 1.9 mT, sin explorar el ICR (Beutner et al, 2025).

Las disminuciones en el ICR de mitocondrias aisladas de hígado de rata observadas en el presente estudio obedecen principalmente a aumentos en el estado 4, determinados a 150 mT a 30, 45 y 60 min de exposición (Tabla 2). Resulta difícil hacer una comparación objetiva entre los hallazgos de los dos estudios pues los rangos de intensidad de campo magnético en los que fueron evaluados los efectos difieren varios órdenes de magnitud. En principio, se podría adelantar que las direcciones de los efectos dependen en buena medida de la magnitud del campo magnético aplicado. No se encontraron reportes en la literatura en los que se evalúen cambios en los niveles de ATP de mitocondrias aisladas expuestas a campos magnéticos estáticos o variables. En un contexto celular, Polidori y colaboradores (2012) habían encontrado con anterioridad un aumento leve en marcadores de biogénesis mitocondrial y del metabolismo energético en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) en cultivo expuestas a un campo magnético estático de 300 mT, indicando una promoción en la función mitocondrial (Polidori et al. 2012).

Este hallazgo contrastaría con la disminución en el ICR observado en las células C2C12 expuestas a campos de 150 y 300 mT del presente estudio. Sin embargo, debe tenerse en cuenta

que el grupo de Polidori usó tiempos de exposición de entre 4 y 24 h, muy superiores a los usados en el presente estudio. Además, se espera que las células musculares C2C12 tengan mayor densidad mitocondrial que las células endoteliales vasculares HUVEC (Barbieri et al., 2011, B. Kim et al., 2014), dificultando una vez más una comparación objetiva. En este sentido, se podría pensar que mayores tiempos de exposición podrían permitir que la disfunción mitocondrial temprana generada por la exposición al campo magnético induzca una respuesta de adaptación mediante biogénesis mitocondrial que conduce a una mayor masa mitocondrial y, por tanto, a una promoción de las funciones mitocondriales.

Por otra parte, Wang y colaboradores (2018) obtuvieron resultados similares a los de este estudio, al observar que campos magnéticos estáticos en un rango de magnitud comparable (260 y 500 mT) no produjeron alteraciones en los niveles de ATP después de una exposición de 6 h en diferentes líneas celulares, incluyendo células de cáncer adrenal de rata PC12, cáncer cervical HeLa, cáncer de sangre periférica MV-4-11 y cáncer gastrointestinal GIST-T1, así como en las líneas no cancerosas de ovario de hámster chino CHO y de epitelio de pigmento retinal humano RPE1. Sin embargo, la exposición a un campo de magnitud de 1000 mT por 6 h indujo aumentos en los niveles de ATP de estas líneas celulares. También se observaron disminuciones en los niveles de ATP a un campo magnético superior de 9000 mT, indicando una dependencia de los niveles de ATP con la magnitud de la intensidad del campo magnético aplicado (Wang et al. 2018).

Asimismo, Zhao y colaboradores (2011) llevaron a cabo un estudio en células híbridas humano-hámster AL expuestas a campos magnéticos estáticos entre 1000 y 8500 mT. Los autores observaron una disminución significativa en el contenido intracelular de ATP únicamente a una

intensidad de 8500 mT, mientras que las células expuestas a intensidades menores no presentaron cambios significativos, incluso tras tiempos de exposición de hasta 5 horas (Zhao et al., 2011).

Cabe señalar que en este estudio no fue posible explorar otros rangos de intensidad de campo magnético debido a limitaciones técnicas asociadas a la capacidad de las fuentes de poder y del electroimán utilizado. Por esta razón, no se descarta que intensidades diferentes hubieran generado respuestas bioenergéticas distintas a las observadas en las condiciones evaluadas.

En este estudio se observó disminución del ICR en mitocondrias aisladas (Figura 9) y células C2C12 (Figura 10) sin cambios significativos en los niveles de ATP (Figuras 11 y 12), lo cual se podría considerar contradictorio en principio. Sin embargo, debe notarse que las disminuciones en el ICR se deben principalmente a aumentos en los consumos de oxígeno en el estado 4 (Tablas 2, 5 y 6), más que a disminuciones en el estado 3. El consumo de oxígeno en el estado 3 es la respiración estimulada por el ADP, acoplada a la síntesis de ATP; mientras que el consumo de oxígeno en el estado 4 se asocia con una respiración basal en la que no existe una demanda energética para la célula (Barrientos et al., 2009).

Normalmente, el consumo de oxígeno en el estado 4 debería ser bajo y un incremento en este podría indicar algún tipo de desacoplamiento energético en la membrana mitocondrial interna o estrés oxidante afectando elementos de la cadena de transporte de electrones (Beutner et al., 2025). Sin alteraciones significativas en el consumo de oxígeno en el estado 3, no resultaría completamente contradictorio una ausencia de cambios en los niveles de ATP, tanto de mitocondria aislada como de células C2C12. Por otro lado, en el contexto celular, es posible que

se estén presentando procesos de generación de ATP compensatorios, por ejemplo, mediante glicólisis, que permitan mantener estables estos niveles (X. Guo et al., 2012)

Una de las posibles estructuras susceptibles a la interacción con campos magnéticos es la ATP sintasa, enzima responsable de la síntesis de ATP a partir del gradiente protónico generado por la cadena respiratoria. La ATP sintasa funciona como un motor rotatorio molecular impulsado por el flujo de protones a través de la membrana mitocondrial interna, proceso que involucra movimientos conformacionales y transferencia de cargas eléctricas (Itoh et al., 2004).

Debido a esta naturaleza electroquímica y rotacional, se ha planteado la posibilidad de que campos magnéticos externos puedan modificar parcialmente la dinámica de rotación, el flujo de protones o la eficiencia de acoplamiento de la enzima. Nuestro grupo de investigación ha explorado esta hipótesis mediante aproximaciones computacionales orientadas a evaluar posibles cambios estructurales y energéticos de la ATP sintasa bajo exposición magnética (resultados no publicados).

Otros componentes de la cadena de transporte de electrones podrían actuar como posibles blancos moleculares de los campos magnéticos. Entre ellos se encuentran los centros hierro–azufre (Fe-S), presentes principalmente en los complejos I, II y III, así como los grupos hemo de los citocromos. Estas estructuras participan directamente en las reacciones de transferencia electrónica y poseen propiedades paramagnéticas asociadas a la presencia de hierro y electrones desapareados.

Los centros Fe-S, por ejemplo, han sido estudiados como parte del sistema MagR, en el cual se ha propuesto una posible sensibilidad a campos magnéticos asociada a procesos de transferencia electrónica, como fue descrito por Guo y colaboradores, (Z. Guo et al., 2021). En este contexto, alteraciones en la dinámica de transferencia electrónica podrían modificar el gradiente electroquímico mitocondrial, afectar la producción de ATP y favorecer la generación de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, algunos estudios sugieren que mecanismos basados en pares radicalarios podrían participar en la sensibilidad biológica a los campos magnéticos, especialmente en sistemas ricos en reacciones redox mitocondriales (Zadeh-Haghighi & Simon, 2022).

Asimismo, la presencia de grupos hemo en proteínas respiratorias como los citocromos podría conferir susceptibilidad adicional frente a campos magnéticos externos, debido a las propiedades magnéticas del hierro contenido en estos complejos. La literatura indica que el hierro mitocondrial y los grupos hemo desempeñan un papel esencial en la estabilidad y funcionamiento de los complejos respiratorios (Johnson DC. et. al., 2005) por lo que pequeñas alteraciones en estos sistemas podrían traducirse en cambios bioenergéticos detectables. En conjunto, estos antecedentes apoyan la hipótesis de que los campos magnéticos podrían interactuar con componentes electroactivos de la mitocondria, modulando procesos relacionados con la transferencia electrónica, el potencial de membrana y la síntesis de ATP.

Finalmente, los resultados obtenidos permiten plantear que los campos magnéticos podrían interactuar con procesos mitocondriales, generando modificaciones en parámetros bioenergéticos como el ICR y la producción de ATP. Aunque las respuestas observadas en este estudio y trabajos

anteriores fueron variables dependiendo de la intensidad del campo y del sistema biológico evaluado, en conjunto estas apoyan la existencia de una posible sensibilidad mitocondrial frente a efectos de campo magnéticos estáticos externos. No obstante, se requieren estudios adicionales que permitan profundizar en los mecanismos moleculares implicados y establecer con mayor claridad las implicaciones fisiológicas y biofísicas de estas interacciones.

Para futuros estudios, se recomienda evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno para investigar su posible participación en los efectos inducidos por los campos magnéticos. Además, sería pertinente explorar otros rangos de intensidad y diferentes tiempos de exposición que no se pudieron evaluar en esta investigación. Por último, se propone realizar estudios comparativos utilizando líneas celulares con menor masa mitocondrial, lo que permitiría determinar con mayor precisión la contribución de las mitocondrias a los efectos observados.

10. Conclusiones

El montaje experimental diseñado cumplió satisfactoriamente con los requerimientos establecidos para evaluar el efecto de campos magnéticos estáticos sobre células y mitocondrias. Las condiciones de temperatura se mantuvieron estables durante todo el procedimiento, y las muestras conservaron su viabilidad a lo largo de las exposiciones. Además, fue posible medir de manera confiable tanto la temperatura como la intensidad del campo magnético aplicado. Estas condiciones permitieron realizar los experimentos bajo parámetros controlados y reproducibles, garantizando la validez y confiabilidad de los análisis. Sin embargo, una de las limitaciones del

estudio fue la imposibilidad de evaluar intensidades de campo magnético fuera de los rangos establecidos experimentalmente.

Los campos magnéticos estáticos de intensidad moderada (150–450 mT) inducen alteraciones en la función mitocondrial tanto en mitocondrias aisladas como en células C2C12, reflejadas principalmente en cambios del ICR.

La exposición a campos magnéticos estáticos de 150, 300 y 450 mT no produjo efectos significativos en la síntesis de ATP, tanto en mitocondrias aisladas de hígado de rata como en células musculares C2C12. Se hace necesario explorar estos efectos a mayores intensidades de campo magnético, tiempos y con tipos celulares de diferente densidad mitocondrial.

11. Recomendaciones

Continuar con el estudio de estas alteraciones físicas ya que, según los resultados observados en este proyecto, podría haber un potencial beneficio en este tipo de exposición a campos magnéticos.

Se recomienda que futuras investigaciones evalúen un mayor rango de intensidades de campo magnético con tiempos de exposición más prolongados, con el propósito de identificar posibles efectos dependientes de la intensidad de campo y del tiempo, así como profundizar en los posibles mecanismos asociados a la interacción entre los campos magnéticos y la función mitocondrial.

Para futuros estudios se recomienda evaluar los niveles de especies reactivas de oxígeno y marcadores de estrés oxidante en células y mitocondrias expuestas a campo magnéticos.

Referencias Bibliográficas

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>
- Adachi, H., Fujiyama, S., & Tsubota, M. (2010). Steady-state counterflow quantum turbulence: Simulation of vortex filaments using the full Biot-Savart law. *Physical Review B*, 81(10), 104511.
- Ahmad, Z., & Cox, J. L. (2014). ATP synthase: the right size base model for nanomotors in nanomedicine. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 567398. <https://doi.org/10.1155/2014/567398>
- Annesley, S. J., & Fisher, P. R. (2019). Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, 8(7), 680. <https://doi.org/10.3390/cells8070680>
- Baker, M. J., Frazier, A. E., Gulbis, J. M., & Ryan, M. T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends in Cell Biology*, 17(9), 456–464.
- Barbieri, E., Battistelli, M., Casadei, L., Vallorani, L., Piccoli, G., Guescini, M., Gioacchini, A. M., Polidori, E., Zeppa, S., Ceccaroli, P., Stocchi, L., Stocchi, V., & Falcieri, E. (2011). Morphofunctional and Biochemical Approaches for Studying Mitochondrial Changes during Myoblasts Differentiation. *Journal of Aging Research*, 2011(1), 845379. <https://doi.org/https://doi.org/10.4061/2011/845379>
- Barrientos, A., Fontanesi, F., & Díaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme

assays. *Current Protocols in Human Genetics*, Chapter 19, Unit19.3.
<https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1903s63>

Beutner, G., Yuh, H.-J., Goldenberg, I., Wallace, D. C., Porter, G. A. J., Moss, A. J., & Sheu, S.-S. (2025). Low magnetic fields stimulate cardiac mitochondrial bioenergetics with a bell-shaped response: Possibly via a radical pair mechanism. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 30, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2025.11.055>

Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., & Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene*, 34(12), 1475–1486.

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312.

Brown, G. C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochemical Journal*, 284(1), 1–13.

Chionna, A., Dwikat, M., Panzarini, E., Tenuzzo, B., Carlà, E. C., Verri, T., Pagliara, P., Abbro, L., & Dini, L. (2003). Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 47(4), 299–308.

Council, N. R. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals: Washington*. DC: The National Academies Press.

Facundo, H. T. F., Fornazari, M., & Kowaltowski, A. J. (2006). Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(2), 202–212.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.06.003>

- Funk, R. H. W., Monsees, T., & Ozkucur, N. (2009). Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43(4), 177–264. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2008.07.001>
- Grassi, C., D'Ascenzo, M., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., & Azzena, G. B. (2004). Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*, 35(4), 307–315.
- Gunter, K. K., & Gunter, T. E. (1994). Transport of calcium by mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26(5), 471–485. <https://doi.org/10.1007/BF00762732>
- Guo, X., Li, H., Xu, H., Woo, S., Dong, H., Lu, F., Lange, A. J., & Wu, C. (2012). Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(4), 358–367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.002>
- Guo, Z., Xu, S., Chen, X., Wang, C., Yang, P., Qin, S., Zhao, C., Fei, F., Zhao, X., Tan, P.-H., Wang, J., & Xie, C. (2021). Modulation of MagR magnetic properties via iron–sulfur cluster binding. *Scientific Reports*, 11(1), 23941. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03344-2>
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*, 427(6973), 465–468. <https://doi.org/10.1038/nature02212>
- Jang, M., Scheffold, J., Røst, L. M., Cheon, H., & Bruheim, P. (2022). Serum-free cultures of C2C12 cells show different muscle phenotypes which can be estimated by metabolic profiling. *Scientific Reports*, 12(1), 827. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04804-z>
- Kim, B., Lee, H., Kawata, K., & Park, J.-Y. (2014). Exercise-mediated wall shear stress increases

mitochondrial biogenesis in vascular endothelium. *PloS One*, 9(11), e111409.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111409>

Kim, Y., Kim, Y.-S., Kim, D. E., Lee, J. S., Song, J. H., Kim, H.-G., Cho, D.-H., Jeong, S.-Y., Jin, D.-H., & Jang, S. J. (2013). BIX-01294 induces autophagy-associated cell death via EHMT2/G9a dysfunction and intracellular reactive oxygen species production. *Autophagy*, 9(12), 2126–2139.

Lobo-Jarne, T., & Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 76, 179–190.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.021>

Nakahara, T., Yaguchi, H., Yoshida, M., & Miyakoshi, J. (2002). Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology*, 224(3), 817–822.
<https://doi.org/10.1148/radiol.2243011300>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Principios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora.

Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>

Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchon, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(6), 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>

Pallotti, F., & Lenaz, G. (2007). Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods in Cell Biology*, 80, 3–44. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80001-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80001-4)

- Pollard, A. K., Craig, E. L., & Chakrabarti, L. (2016). Mitochondrial Complex 1 Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration. *PloS One*, *11*(6), e0157405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157405>
- Przybyla-Toscano, J., Christ, L., Keech, O., & Rouhier, N. (2021). Iron-sulfur proteins in plant mitochondria: roles and maturation. *Journal of Experimental Botany*, *72*(6), 2014–2044. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa578>
- Rosen, A. D., & Chastney, E. E. (2009). Effect of long term exposure to 0.5 T static magnetic fields on growth and size of GH3 cells. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, *30*(2), 114–119.
- Schenck, J. F. (2005). Physical interactions of static magnetic fields with living tissues. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *87*(2–3), 185–204.
- Strieth, S., Strelczyk, D., Eichhorn, M. E., Dellian, M., Luedemann, S., Griebel, J., Bellemann, M., Berghaus, A., & Brix, G. (2008). Static magnetic fields induce blood flow decrease and platelet adherence in tumor microvessels. *Cancer Biology & Therapy*, *7*(6), 814–819. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.6.5837>
- Wang, D., Wang, Z., Zhang, L., Li, Z., Tian, X., Fang, J., Lu, Q., & Zhang, X. (2018). Cellular ATP levels are affected by moderate and strong static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, *39*(5), 352–360. <https://doi.org/10.1002/bem.22122>
- Wang, D., Zhang, L., Shao, G., Yang, S., Tao, S., Fang, K., & Zhang, X. (2018). 6-mT 0–120-Hz

magnetic fields differentially affect cellular ATP levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(28), 28237–28247. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2868-3>

Zadeh-Haghighi, H., & Simon, C. (2022). Magnetic field effects in biology from the perspective of the radical pair mechanism. *Journal of the Royal Society, Interface*, 19(193), 20220325. <https://doi.org/10.1098/rsif.2022.0325>

Zederbauer, M., Furtmüller, P. G., Brogioni, S., Jakopitsch, C., Smulevich, G., & Obinger, C. (2007). Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Natural Product Reports*, 24(3), 571–584. <https://doi.org/10.1039/b604178g>

Zhao, G., Chen, S., Wang, L., Zhao, Y., Wang, J., Wang, X., Zhang, W., Wu, R., Wu, L., & Wu, Y. (2011). Cellular ATP content was decreased by a homogeneous 8.5 T static magnetic field exposure: role of reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics*, 32(2), 94–101.

Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15.

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., & Enriquez, J. A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell*, 32(4), 529–539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021>

Adachi, H., Fujiyama, S., & Tsubota, M. (2010). Steady-state counterflow quantum turbulence: Simulation of vortex filaments using the full Biot-Savart law. *Physical Review B*, 81(10), 104511.

Ahmad, Z., & Cox, J. L. (2014). ATP synthase: the right size base model for nanomotors in

nanomedicine. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 567398.
<https://doi.org/10.1155/2014/567398>

Annesley, S. J., & Fisher, P. R. (2019). Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, 8(7), 680.
<https://doi.org/10.3390/cells8070680>

Baker, M. J., Frazier, A. E., Gulbis, J. M., & Ryan, M. T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends in Cell Biology*, 17(9), 456–464.

Barbieri, E., Battistelli, M., Casadei, L., Vallorani, L., Piccoli, G., Guescini, M., Gioacchini, A. M., Polidori, E., Zeppa, S., Ceccaroli, P., Stocchi, L., Stocchi, V., & Falcieri, E. (2011). Morphofunctional and Biochemical Approaches for Studying Mitochondrial Changes during Myoblasts Differentiation. *Journal of Aging Research*, 2011(1), 845379.
<https://doi.org/https://doi.org/10.4061/2011/845379>

Barrientos, A., Fontanesi, F., & Díaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Current Protocols in Human Genetics*, Chapter 19, Unit19.3.
<https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1903s63>

Beutner, G., Yuh, H.-J., Goldenberg, I., Wallace, D. C., Porter, G. A. J., Moss, A. J., & Sheu, S.-S. (2025). Low magnetic fields stimulate cardiac mitochondrial bioenergetics with a bell-shaped response: Possibly via a radical pair mechanism. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 30, 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2025.11.055>

Bonora, M., Wieckowski, M. R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., & Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in

mitochondrial permeability transition. *Oncogene*, 34(12), 1475–1486.

Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, 435(2), 297–312.

Brown, G. C. (1992). Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochemical Journal*, 284(1), 1–13.

Chionna, A., Dwikat, M., Panzarini, E., Tenuzzo, B., Carlà, E. C., Verri, T., Pagliara, P., Abbro, L., & Dini, L. (2003). Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *European Journal of Histochemistry : EJH*, 47(4), 299–308.

Council, N. R. (2011). *Guide for the care and use of laboratory animals: Washington*. DC: The National Academies Press.

Facundo, H. T. F., Fornazari, M., & Kowaltowski, A. J. (2006). Tissue protection mediated by mitochondrial K⁺ channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(2), 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.06.003>

Funk, R. H. W., Monsees, T., & Ozkucur, N. (2009). Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43(4), 177–264. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2008.07.001>

Grassi, C., D'Ascenzo, M., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., & Azzena, G. B. (2004). Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca²⁺ channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium*, 35(4), 307–315.

Gunter, K. K., & Gunter, T. E. (1994). Transport of calcium by mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 26(5), 471–485. <https://doi.org/10.1007/BF00762732>

- Guo, X., Li, H., Xu, H., Woo, S., Dong, H., Lu, F., Lange, A. J., & Wu, C. (2012). Glycolysis in the control of blood glucose homeostasis. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(4), 358–367. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.06.002>
- Guo, Z., Xu, S., Chen, X., Wang, C., Yang, P., Qin, S., Zhao, C., Fei, F., Zhao, X., Tan, P.-H., Wang, J., & Xie, C. (2021). Modulation of MagR magnetic properties via iron–sulfur cluster binding. *Scientific Reports*, 11(1), 23941. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03344-2>
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*, 427(6973), 465–468. <https://doi.org/10.1038/nature02212>
- Jang, M., Scheffold, J., Røst, L. M., Cheon, H., & Bruheim, P. (2022). Serum-free cultures of C2C12 cells show different muscle phenotypes which can be estimated by metabolic profiling. *Scientific Reports*, 12(1), 827. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-04804-z>
- Kim, B., Lee, H., Kawata, K., & Park, J.-Y. (2014). Exercise-mediated wall shear stress increases mitochondrial biogenesis in vascular endothelium. *PloS One*, 9(11), e111409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111409>
- Kim, Y., Kim, Y.-S., Kim, D. E., Lee, J. S., Song, J. H., Kim, H.-G., Cho, D.-H., Jeong, S.-Y., Jin, D.-H., & Jang, S. J. (2013). BIX-01294 induces autophagy-associated cell death via EHMT2/G9a dysfunction and intracellular reactive oxygen species production. *Autophagy*, 9(12), 2126–2139.
- Lobo-Jarne, T., & Ugalde, C. (2018). Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 76, 179–190.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.021>

Nakahara, T., Yaguchi, H., Yoshida, M., & Miyakoshi, J. (2002). Effects of exposure of CHO-K1 cells to a 10-T static magnetic field. *Radiology*, *224*(3), 817–822. <https://doi.org/10.1148/radiol.2243011300>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Principios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora.

Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, *148*(6), 1145–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>

Osellame, L. D., Blacker, T. S., & Duchen, M. R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *26*(6), 711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>

Pallotti, F., & Lenaz, G. (2007). Isolation and subfractionation of mitochondria from animal cells and tissue culture lines. *Methods in Cell Biology*, *80*, 3–44. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80001-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80001-4)

Pollard, A. K., Craig, E. L., & Chakrabarti, L. (2016). Mitochondrial Complex 1 Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration. *PloS One*, *11*(6), e0157405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157405>

Przybyla-Toscano, J., Christ, L., Keech, O., & Rouhier, N. (2021). Iron-sulfur proteins in plant mitochondria: roles and maturation. *Journal of Experimental Botany*, *72*(6), 2014–2044. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa578>

Rosen, A. D., & Chastney, E. E. (2009). Effect of long term exposure to 0.5 T static magnetic

fields on growth and size of GH3 cells. *Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association*, 30(2), 114–119.

Schenck, J. F. (2005). Physical interactions of static magnetic fields with living tissues. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 87(2–3), 185–204.

Strieth, S., Strelczyk, D., Eichhorn, M. E., Dellian, M., Luedemann, S., Griebel, J., Bellemann, M., Berghaus, A., & Brix, G. (2008). Static magnetic fields induce blood flow decrease and platelet adherence in tumor microvessels. *Cancer Biology & Therapy*, 7(6), 814–819.
<https://doi.org/10.4161/cbt.7.6.5837>

Wang, D., Wang, Z., Zhang, L., Li, Z., Tian, X., Fang, J., Lu, Q., & Zhang, X. (2018). Cellular ATP levels are affected by moderate and strong static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*, 39(5), 352–360. <https://doi.org/10.1002/bem.22122>

Wang, D., Zhang, L., Shao, G., Yang, S., Tao, S., Fang, K., & Zhang, X. (2018). 6-mT 0–120-Hz magnetic fields differentially affect cellular ATP levels. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(28), 28237–28247. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2868-3>

Zadeh-Haghighi, H., & Simon, C. (2022). Magnetic field effects in biology from the perspective of the radical pair mechanism. *Journal of the Royal Society, Interface*, 19(193), 20220325.
<https://doi.org/10.1098/rsif.2022.0325>

Zederbauer, M., Furtmüller, P. G., Brogioni, S., Jakopitsch, C., Smulevich, G., & Obinger, C. (2007). Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. *Natural Product Reports*, 24(3), 571–584.

<https://doi.org/10.1039/b604178g>

Zhao, G., Chen, S., Wang, L., Zhao, Y., Wang, J., Wang, X., Zhang, W., Wu, R., Wu, L., & Wu, Y. (2011). Cellular ATP content was decreased by a homogeneous 8.5 T static magnetic field exposure: role of reactive oxygen species. *Bioelectromagnetics*, *32*(2), 94–101.

Zhao, R., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. *International Journal of Molecular Medicine*, *44*(1), 3–15.