



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía y Radiología
Área de Anatomía y Embriología Humana

TESIS DOCTORAL:

**Caracterización y cuantificación de la influencia de la
música como agente físico sobre el comportamiento de
células madre neurales embrionarias en cultivo**

Presentada por Neysa Navarro Fernández para optar al grado
de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Prof. Dr. D. Ángel Gato Casado

A Ángel Gato, mi guía en este proyecto personal, por su saber y su apoyo incluso cuando nada parecía tener sentido y por creer en esta “locura” desde el primer día hasta el último.

A Carlos, por su presencia “física”, imprescindible para que nuestro estudio pudiese sonar y por la energía que siempre me transmitió.

A Estela, Aníbal y Raquel por su “estrecha” y cálida compañía y sus “buenos humos” cada día.

A Sagrario, por ser, en todo momento, la luz del “túnel”.

Al Dr. Barbosa, a Maribel, a Jose Antonio y a todos los compañeros del departamento, por los cafés-debate que tanto me aportaron y por la ilusión que continuamente me transmitieron.

A Marquitos, a Feliso y a Juani por todas las buenas palabras que me regalaron.

A mi madre, a mi padre, a mis abuelos, a mi hermano, porque les debo todo.

A Rosana, Bea, Camino, Mercedes, Pura, a mis amigos, porque cerca o lejos, estuvieron presentes siempre.

A Dani y Aitor, principio y final de trayecto, por su ser y su estar.

La vida en agrade-cimientos.

A las pequeñas maravillas, grandezas diminutas,
y a quienes las sienten y escuchan.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Prólogo..... | 1 |
| 1. MUSICOTERAPIA | 2 |
| 1.1) Definición..... | 2 |
| 1.2) Aproximación histórica..... | 3 |
| 1.3) Ámbito de aplicación..... | 10 |
| 1.3.1) <i>Área afectiva</i> | 10 |
| 1.3.2) <i>Área comunicacional y social</i> | 10 |
| 1.3.3) <i>Área motriz</i> | 11 |
| a) Pacientes con infarto cerebral..... | 11 |
| b) Pacientes con enfermedad de Parkinson..... | 12 |
| c) Parálisis cerebral..... | 13 |
| 2. MÚSICA | 14 |
| 2.1) Definición..... | 14 |
| 2.2) Elementos..... | 16 |
| 2.3) La música como fenómeno psicológico..... | 17 |
| 2.4) La música como fenómeno físico..... | 18 |
| Propiedades del sonido..... | 20 |
| 3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MÚSICA SOBRE ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS | 21 |
| 3.1) Estudios en pacientes..... | 22 |
| 3.2) Experimentación animal..... | 24 |
| 4. NEUROEPITELIO | 27 |
| 4.1) Formación y maduración..... | 27 |

| | | |
|------|--|-----------|
| 4.2) | Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)..... | 28 |
| 5. | JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO..... | 29 |
| 6. | HIPÓTESIS..... | 30 |
| 7. | PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS..... | 30 |
| | Objetivo general..... | 31 |
| | Objetivos específicos..... | 31 |
| | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 32 |
| 1. | DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 32 |
| 1.1) | Obtención de embriones de ratón (11,5 días p.c.)..... | 32 |
| 1.2) | Realización de cultivo de células madre de mesencéfalo de ratón (11,5 días p.c.)..... | 35 |
| | 1.2.1) <i>Obtención de neuroepitelio mesencefálico</i> | 35 |
| | 1.2.2) <i>Resiembra de células y cultivo</i> | 38 |
| 2. | CONDICIONES EXPERIMENTALES..... | 40 |
| | Nivel de Presión Sonora (L o SPL)..... | 42 |
| | Nivel de Presión Sonora Equivalente (L_{eq})..... | 42 |
| | Nivel de Presión Sonora Máximo (L_{max})..... | 42 |
| 2.1) | Ruido del incubador: Silencio..... | 43 |
| 2.2) | Música..... | 44 |
| 2.3) | Ruido..... | 47 |
| 3. | OTRAS CONDICIONES EXPERIMENTALES..... | 55 |
| 3.1) | Reducción del tiempo de exposición al estímulo sonoro..... | 55 |
| 3.2) | Valoración del exceso de vibración..... | 55 |
| 3.3) | Valoración de elementos propios de la música..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 4. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA..... | 60 |
| 4.1) Estudio de la supervivencia celular: T.U.N.E.L..... | 60 |
| 4.2) Estudio de la proliferación: BrdU..... | 61 |
| 4.3) Estudio de la diferenciación celular: β -III-Tubulina..... | 62 |
| 5. ANÁLISIS DE LOS CULTIVOS CELULARES..... | 63 |
| 5.1) Estudio del índice de muerte celular programada (IMCP): Conteo de muerte celular..... | 63 |
| 5.2) Estudio de la proliferación celular: Conteo de mitosis..... | 64 |
| 5.3) Estudio de la diferenciación celular: Conteo de células β -III-Tubulina positivas..... | 65 |
| RESULTADOS..... | 67 |
| 1. COMPORTAMIENTO CELULAR TRAS EXPOSICIÓN A MÚSICA, RUIDO O SILENCIO DURANTE 24 Ó 72 HORAS..... | 67 |
| 1.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 68 |
| 1.1.1) <i>Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) 24 horas.....</i> | <i>68</i> |
| 1.2.1) <i>Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) 72 horas.....</i> | <i>73</i> |
| 1.2) Índice de replicación celular a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 78 |
| 1.2.1) <i>Índice de replicación celular 24 horas.....</i> | <i>78</i> |
| 1.2.2) <i>Índice de replicación celular 72 horas.....</i> | <i>83</i> |
| 1.3) Índice de neurogénesis celular a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 88 |
| 1.3.1) <i>Índice de neurogénesis celular 24 horas.....</i> | <i>88</i> |
| 1.3.2) <i>Índice de neurogénesis celular 24 horas.....</i> | <i>93</i> |
| 1.4) Comportamiento celular a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio: valoración final..... | 98 |

| | |
|---|------------|
| 2. COMPORTAMIENTO CELULAR TRAS EXPOSICIÓN A MÚSICA, RUIDO O SILENCIO DURANTE 24 HORAS CON VIBRACIÓN VERSUS SIN VIBRACIÓN..... | 98 |
| 2.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) con y sin vibración..... | 99 |
| 2.2) Replicación celular con y sin vibración..... | 104 |
| 2.3) Neurogénesis con y sin vibración..... | 109 |
| 3. VALORACIÓN DE COMPONENTES BÁSICOS DE LA MÚSICA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CELULAR..... | 113 |
| 3.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) con pulso, pulso nota o silencio..... | 113 |
| 3.2) Replicación celular con pulso, pulso nota o silencio..... | 117 |
| 3.3) Neurogénesis con pulso, pulso nota o silencio..... | 120 |
| DISCUSIÓN..... | 123 |
| 1. VALORACIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS..... | 123 |
| 2. INFLUENCIA DE LOS ESTÍMULOS SONOROS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE MECANISMOS INDIRECTOS..... | 124 |
| 3. INFLUENCIA DE LOS ESTÍMULOS SONOROS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE MECANISMOS DIRECTOS..... | 125 |
| 4. LAS CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ESTÍMULO SONORO CONDICIONAN LA RESPUESTA CELULAR..... | 130 |
| CONCLUSIONES..... | 133 |
| GLOSARIO DE ABREVIATURAS..... | 134 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 136 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Fig. 1.- Ratonas preñadas 11,5 días p.c..... | 32 |
| Fig. 2.- Material de extracción del útero..... | 33 |
| Fig. 3.- Laparotomía ventral media..... | 33 |
| Fig. 4.- Lupa..... | 34 |
| Fig. 5.- Útero en “collar de cuentas”..... | 34 |
| Fig. 6.- Engrosamiento uterino..... | 34 |
| Fig. 7.- Embrión 11,5 días p.c..... | 34 |
| Fig. 8.- Material para la obtención del mesencéfalo..... | 36 |
| Fig. 9.- Mesencéfalo dorsal de embrión 11,5 días p.c..... | 36 |
| Fig. 10.- Centrífuga..... | 37 |
| Fig. 11.- Placas de Petri con cultivo celular..... | 37 |
| Fig. 12.- Esquema del diseño experimental..... | 39 |
| Fig. 13.- Equipo empleado para el registro de las mediciones acústicas..... | 40 |
| Fig. 14.- Células T.U.N.E.L. positiva (2) y T.U.N.E.L. negativa (1)..... | 64 |
| Fig. 15.- Células BrdU positiva (1) y BrdU negativa (2)..... | 65 |
| Fig. 16.- Células β -III-Tubulina positiva (2) y β -III-Tubulina negativa (1)..... | 66 |
| Fig. 17.- 24h T.U.N.E.L. Música..... | 70 |
| Fig. 18.- 24h T.U.N.E.L. Ruido..... | 71 |
| Fig. 19.- 24h T.U.N.E.L. Silencio..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| Fig. 20.- 72h T.U.N.E.L. Música..... | 75 |
| Fig. 21.- 72h T.U.N.E.L. Ruido..... | 76 |
| Fig. 22.- 72h T.U.N.E.L. Silencio..... | 77 |
| Fig. 23.- 24h BrdU Música..... | 80 |
| Fig. 24.- 24h BrdU Ruido..... | 81 |
| Fig. 25.- 24h BrdU Silencio..... | 82 |
| Fig. 26.- 72h BrdU Música..... | 85 |
| Fig. 27.- 72h BrdU Ruido..... | 86 |
| Fig. 28.- 72h BrdU Silencio..... | 87 |
| Fig. 29.- 24h β -III-Tubulina Música..... | 90 |
| Fig. 30.- 24h β -III-Tubulina Ruido..... | 91 |
| Fig. 31.- 24h β -III-Tubulina Silencio..... | 92 |
| Fig. 32.- 72h β -III-Tubulina Música..... | 95 |
| Fig. 33.- 72h β -III-Tubulina Ruido..... | 96 |
| Fig. 34.- 72h β -III-Tubulina Silencio..... | 97 |
| Fig. 35.- Con Vibración T.U.N.E.L. Música..... | 101 |
| Fig. 36.- Sin Vibración T.U.N.E.L. Música..... | 101 |
| Fig. 37.- Con Vibración T.U.N.E.L. Ruido..... | 102 |
| Fig. 38.- Sin Vibración T.U.N.E.L. Ruido..... | 102 |
| Fig. 39.- Con Vibración T.U.N.E.L. Silencio..... | 103 |
| Fig. 40.- Sin Vibración T.U.N.E.L. Silencio..... | 103 |

| | |
|---|-----|
| Fig. 41.- Con Vibración BrdU Música..... | 106 |
| Fig. 42.- Sin Vibración BrdU Música..... | 106 |
| Fig. 43.- Con Vibración BrdU Ruido..... | 107 |
| Fig. 44.- Sin Vibración BrdU Ruido..... | 107 |
| Fig. 45.- Con Vibración BrdU Silencio..... | 108 |
| Fig. 46.- Sin Vibración BrdU Silencio..... | 108 |
| Fig. 47.- Con Vibración β -III-Tubulina Música..... | 110 |
| Fig. 48.- Sin Vibración β -III-Tubulina Música..... | 110 |
| Fig. 49.- Con Vibración β -III-Tubulina Ruido..... | 111 |
| Fig. 50.- Sin Vibración β -III-Tubulina Ruido..... | 111 |
| Fig. 51.- Con Vibración β -III-Tubulina Silencio..... | 112 |
| Fig. 52.- Sin Vibración β -III-Tubulina Silencio..... | 112 |
| Fig. 53.- TUNEL con Pulso, Pulso Nota y Silencio..... | 116 |
| Fig. 54.- BrdU con Pulso, Pulso Nota y Silencio..... | 119 |
| Fig. 55.- β -III-Tubulina Con Pulso, Pulso Nota y Silencio..... | 122 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | Pág. |
|--|-------------|
| Gráfico 1.- Distintos momentos del espectro, en función del tiempo y la intensidad sonora, para la música..... | 46 |
| 1-A.- Espectro entre t= 30 y t =40 segundos, orquesta (dB)..... | 45 |

| | |
|---|----|
| 1-B.- Espectro entre t = 2:25 s y 2:35 s, arpa y flauta (dB)..... | 46 |
| 1-C.- Espectro entre 9:01 y 9:06 arpa sola (dB)..... | 46 |
| Gráfico 2.- Espectro de frecuencia del ruido rosa empleado de 10 segundos de duración..... | 47 |
| Gráfico 3.- Intensidad sonora del ruido rosa empleado en función de la frecuencia de registro..... | 48 |
| Gráfico 4.- Espectros de frecuencias de la música y el ruido rosa empleados y del ruido blanco..... | 49 |
| 4-A.- Espectro de frecuencias de la música empleada..... | 49 |
| 4-B.- Espectro de frecuencias del ruido rosa empleado..... | 49 |
| 4-C.- Espectro de frecuencias del ruido blanco..... | 49 |
| Gráfico 5.- Presión sonora del ruido rosa en función del tiempo: intervalos de 11 minutos, 1 décima de segundo y 1 centésima de segundo de arriba abajo respectivamente..... | 51 |
| Gráfico 6.- Presión sonora de la música empleada en función del tiempo: de arriba abajo pieza completa, una décima de segundo y una centésima de segundo respectivamente..... | 52 |
| Gráfico 7.- Esquema del interior de la cámara de cultivo en condiciones de amortiguación de la vibración..... | 56 |
| Gráfico 8.- Registro de las aceleraciones recibidas por las células en las condiciones de Silencio y Ruido..... | 56 |
| Gráfico 9.- Análisis de frecuencia del pulso (metrónomo)..... | 58 |

| | |
|--|-----|
| Gráfico 10.- Análisis de frecuencia del “pulso nota” | 58 |
| Gráfico 11.- Espectro temporal y de frecuencia del pulso (metrónomo): se observan dos pulsos..... | 59 |
| Gráfico 12.- Espectro temporal y de frecuencia del “pulso nota”: se observan dos pulsos..... | 59 |
| Gráfico 13.- Índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 69 |
| Gráfico 14.- Índice de muerte celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 74 |
| Gráfico 15.- Índice de replicación celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 79 |
| Gráfico 16.- Índice de replicación celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 84 |
| Gráfico 17.- Índice de neurogénesis celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 89 |
| Gráfico 18.- Índice de neurogénesis celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 94 |
| Gráfico 19.- Índice de muerte celular tras exposición a música, ruido o silencio con y sin vibración..... | 100 |
| Gráfico 20.- Índice de replicación celular tras exposición a música, ruido o silencio con y sin vibración..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico 21.- Índice de neurogénesis celular tras exposición a música, ruido o silencio con y sin vibración..... | 109 |
| Gráfico 22.- Índice de muerte celular tras exposición a pulso, pulso-nota y Silencio..... | 115 |
| Gráfico 23.- Índice de replicación celular tras exposición a pulso, pulso-nota y Silencio..... | 118 |
| Gráfico 24.- Índice de neurogénesis celular tras exposición a pulso, pulso-nota y silencio..... | 121 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1.- Medición del L_{eq} del ruido del incubador a 125Hz..... | 43 |
| Tabla 2.- L_{eq} L_{max} de la pieza de música orquestal medida por octavas de frecuencia..... | 45 |
| Tabla 3.- Medición del L_{eq} del ruido rosa a 250Hz..... | 50 |
| Tabla 4.- Niveles aproximados de presión acústica para diversos ambientes.. | 53 |
| Tabla 5.- Resumen del proceso experimental..... | 54 |
| Tabla 6.- Anova de las diferencias en el Índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio con $p > 0'05$ | 69 |
| Tabla 7.- Anova de las diferencias en el índice de muerte celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 74 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 8.- Anova de las diferencias en el índice de replicación celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 79 |
| Tabla 9.- Anova de las diferencias en el índice de replicación celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 84 |
| Tabla 10.- Anova de las diferencias en el índice de neurogénesis celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 89 |
| Tabla 11.- Anova de las diferencias en el índice de neurogénesis celular a las 72 horas de exposición a música, ruido o silencio..... | 94 |
| Tabla 12.- T-Student de las diferencias en el índice de muerte celular en condiciones de música, ruido o silencio con y sin vibración..... | 100 |
| Tabla 13.- T-Student de las diferencias en el índice de replicación celular en condiciones de música, ruido o silencio con y sin vibración..... | 105 |
| Tabla 14.- T-Student de las diferencias en el índice de neurogénesis celular en condiciones de música, ruido o silencio con y sin vibración..... | 109 |
| Tabla 15.- Anova de las diferencias en el índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a pulso, pulso nota o silencio..... | 115 |
| Tabla 16.- Anova de las diferencias en el índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a pulso, pulso nota o silencio..... | 118 |
| Tabla 17.- Anova de las diferencias en el índice de neurogénesis celular tras 24 horas de exposición a pulso, pulso nota o silencio..... | 121 |

INTRODUCCIÓN

PRÓLOGO

Crear, interpretar y escuchar música ha sido durante siglos una necesidad primaria para el ser humano. Todos hemos tenido alguna vez la experiencia personal de la capacidad que tiene la música para influir en nuestro estado de ánimo. Desde un punto de vista terapéutico la música siempre ha dotado a las personas de una manera de expresar emociones y sentimientos sin tener que ponerles palabras (Del Campo *et al.* 1997). Esto sucede, por ejemplo, en personas que sufren la enfermedad de Alzheimer. Estas personas, a priori, van perdiendo, entre otras funciones, la capacidad de expresarse con palabras y la de entender lo que se les dice. En un proceso degenerativo de pérdida de memoria, de capacidad de expresión y de capacidades funcionales, el trabajo con música (ej. canciones de su pasado) les proporciona una experiencia estructurada en el espacio y en el tiempo, una vía de recepción y expresión de emociones y un canal de acceso a recuerdos que, además, pueden compartir. Trabajar con estas personas fue una de mis primeras experiencias como musicoterapeuta, pudiendo descubrir a unas personas todavía capaces de comunicarse, de expresar, de crear y de crecer si se les ofrecía el canal de comunicación adecuado, en este caso la música. Pero pude también observar que estos efectos generados por la música, perduraban a corto plazo e incluso eran cada vez más duraderos en el tiempo. Todo ello me llevó a plantearme la hipótesis de que los efectos terapéuticos de la música podían llegar a residir, al menos parcialmente, en cambios estructurales además de emocionales.

1. MUSICOTERAPIA

1.1) Definición

La musicoterapia ha emergido en la segunda parte del siglo XX abriéndose camino dentro del ámbito de actuación médico, social y educacional.

Pero a día de hoy no existe una única definición de lo que es musicoterapia, variando su contenido en los libros de lo más simple a lo más complejo, dependiendo con frecuencia del entorno cultural donde haya crecido la musicoterapia. (Del Campo *et al.* 1997).

Nos ha parecido adecuado, de entre las existentes, recoger la definición elaborada por Patxi del Campo, director de Instituto Música, Arte y Proceso de Vitoria, uno de los centros de mayor recorrido formativo y clínico en este campo en nuestro país.

“La Musicoterapia es la aplicación científica del sonido, la música y el movimiento a través del entrenamiento de la escucha y la ejecución sonora, integrando así lo cognitivo, lo afectivo y lo motriz, desarrollando la conciencia y potenciando el proceso creativo. Así podemos: facilitar la comunicación, promover la expresión individual, favorecer la integración social” *Patxi del Campo, Definición de Musicoterapia* (Dileo 1993). Se trata así de un proceso en el que paciente y terapeuta establecen un vínculo a través de la música con el objetivo de mejorar determinados aspectos antes citados y participar en la recuperación del estado de salud y/o bienestar. En este sentido se plantea como un coadyuvante terapéutico que emplea la música para ayudar a personas a sobrellevar sus problemas de una manera más efectiva.

Se aplica en mayor medida, aunque no exclusivamente, a la evaluación y tratamiento de niños y adultos con discapacidades sensoriales, físicas y de aprendizaje, problemas de salud mental, trastornos en el comportamiento y problemas neurológicos. Los objetivos de la musicoterapia no son musicales (educativos), sino terapéuticos. Y es a través del proceso de hacer música o recibir música como se obtienen beneficios significativos (“WFMT”: World Federation Of Music Therapy, National Appeal for Music Therapy 1994; Del Campo *et al.* 1997).

La musicoterapia, considerada dentro del campo de las psicoterapias, comparte con ellas en general el hecho de ser un proceso en el que paciente y terapeuta establecen un vínculo, y en el que se dan fenómenos de transferencia y contratransferencia. Pero, a diferencia de otras psicoterapias, el vehículo que sirve para establecer el intercambio terapéutico es la música. Esto implica el hecho de emplear un canal alternativo al verbal, a veces más efectivo para la expresión de emociones sin necesidad de procesarlas racionalmente. De esta forma, se da además la oportunidad de expresarse a aquellos que no pueden hacerlo a través de la palabra, como personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer, autismo, etc.

1.2) Aproximación histórica

La música y la medicina han estado firmemente ligadas a lo largo de la historia (Del Campo *et al.* 1997), empleándose la música con fines terapéuticos ya desde el principio de nuestra historia cultural (Conrad *et al.* 2007).

Jauset en su libro "Música y neurociencia: la musicoterapia sus fundamentos, efectos y aplicaciones terapéuticas" en 2008, recoge el recorrido del uso de la música como terapia a lo largo de la historia, texto que hemos considerado a bien emplear como referencia en el contenido de este apartado.

Según Jauset (Jauset 2008), la utilización de la música como terapia hunde sus raíces en la prehistoria, puesto que se sabe que la música estuvo presente en los ritos "mágicos", religiosos y de curación. Sin embargo, los primeros escritos que aluden a la influencia de la música sobre el cuerpo humano son los papiros egipcios descubiertos por Petrie en la ciudad de Kahum en 1889. Estos papiros datan de alrededor del año 1500 a.C. En ellos ya se racionaliza la utilización de la música como un agente capaz de curar el cuerpo, calmar la mente y purificar el alma. Así, por ejemplo, se le atribuye a la música una influencia favorable sobre la fertilidad de la mujer. En el pueblo hebreo también se utilizaba la música en casos de problemas físicos y mentales. De esta época data el primer relato sobre una aplicación de musicoterapia.

Pero fue en la antigua Grecia, en la que se reconocía a Apolo como el Dios de la medicina y de la música, donde se esbozan los fundamentos científicos de la musicoterapia.

De esta época destacan personajes como:

- Pitágoras: habla de la música de las esferas, desarrollando conceptos matemáticos para explicar la armonía en la música en el universo y en el alma humana. Así, según él, la enfermedad mental es resultado de un desorden armónico o musical en el alma humana, concediendo a la música el poder de restablecer la armonía perdida.
- Platón: cree en el carácter divino de la música, y en su capacidad para dar placer o sedar. En su obra "La república" señala la importancia de la música en la educación de los jóvenes y cómo deben interpretarse unas melodías en detrimento de otras.
- Aristóteles: es el primero en teorizar sobre la gran influencia de la música en los seres humanos. A él se debe la teoría del

“Ethos”, palabra griega que puede traducirse como “punto de partida” o “personalidad”. Para la musicoterapia es fundamental esta teoría también conocida como teoría de los modos griegos. En ella se considera que los elementos de la música, como la melodía, la armonía o el ritmo ejercen efectos sobre la parte fisiológica, emocional, espiritual y sobre la fuerza de voluntad del hombre, por ello se vincula un determinado “Ethos” a cada modo o escala, armonía o ritmo.

En la Edad Media destacan 2 teóricos. Por un lado San Basilio, quien escribe una obra titulada “Homilía”, donde destaca que la música calma las pasiones del espíritu y modela sus desarreglos. Y por otro Severino Boecio, quien en su obra más importante “De instituciones Música”, retoma la doctrina ética de la música que señalaba Platón: “por su naturaleza la música es consustancial a nosotros, de tal modo que o bien ennoblece nuestras costumbres o bien las envilece”. Por eso, la música es un potente instrumento educativo y sus efectos, positivos o no, se explican en función de los modos que se utilizan. Severino Boecio reconoce 3 tipos de música:

- Música mundana: está presente entre los elementos del universo.
- Música instrumental.
- Música humana: la música que tenemos dentro de nosotros.

A principios del Renacimiento, uno de los teóricos más importantes en música es el flamenco Joannes Tinctoris, quien desarrolla su actividad en la 2ª mitad del Cuatrocento. Su obra más importante respecto a los efectos que causa la música sobre el sujeto que la percibe se titula “Efectum Musicae”.

En España, durante el Renacimiento, el teórico más importante en relación a la influencia de la música en el hombre es Bartolomé Ramos de Pareja, nacido en Baeza en torno a 1450 (todo ello se puede ver en su obra “Música Práctica”, publicada en Bolonia en 1482).

En esta época surge “la teoría de los afectos” como heredera de la “teoría griega del Ethos” y sirve como base a un nuevo estilo musical: la ópera. En ella retoman como argumento la mitología griega, ejemplo de ello es la primera ópera que se conserva completa, del año 1600, de un compositor italiano llamado Jacobo Peri. Otra obra importante que marca lo que va a ser el estilo operístico del barroco es la ópera “Orfeo” de Claudio Monteverdi.

Pero el teórico que mejor sintetiza la teoría del “Ethos” es un jesuita llamado Athanasio Kircher, que en su obra de 1650 titulada “Misurgia universal” o arte magna de los oídos acordes y discordes, diseña un cuadro sistemático de los efectos que produce en el hombre cada tipo de música. En el barroco también fue importante la figura de un médico inglés llamado Robert Burton, quien escribió una obra en 1632 llamada “The anatomy of melancholy” donde habla de los poderes curativos de la música.

Se empiezan también a estudiar los efectos de la música sobre el organismo, pero desde un punto de vista científico. Destacan varios médicos: El francés Louis Roger o los ingleses Richard Brocklesby y Richard Brown. A este último se debe la obra llamada “Medicina musical”, en la que estudia la aplicación de la música en enfermedades respiratorias, descubriendo que cantar perjudicaba en casos de neumonía y de cualquier trastorno inflamatorio de los pulmones. Pero defiende su uso en los enfermos de asma crónica, demostrando que, si cantaban, los ataques se espaciaban más en el tiempo.

Continúa la utilización de la música cada vez más desde un punto de vista científico. El médico Héctor Chomet, por ejemplo, escribe en 1846 un tratado titulado “La influencia de la música en la salud y la vida”, donde analizaba el uso de la música para prevenir y tratar ciertas enfermedades.

Otros autores importantes son el psiquiatra francés Esquirol y el médico suizo Tissot. Ellos demuestran el efecto físico que producía la música en sus pacientes, pero indican que, en mayor o menor medida, la música alejaba

a los enfermos de sus dolencias, salvo en el caso de los epilépticos, donde la consideran contraindicada.

En España destaca un médico catalán llamado Francisco Vidal Careta, quien realiza una tesis doctoral titulada “La música en sus relaciones con la medicina”. Vidal Careta habla de la música como “un agente que produce descanso, como un elemento más social que el café y el tabaco” y dice que “deberían establecerse orfeones y conciertos populares de música clásica y montarse orquestas en los manicomios”.

La idea de usar la música en terapia tiene así miles de años de antigüedad, pero no es hasta el siglo XX que se recoge y organiza el conocimiento para dar origen a una disciplina terapéutica independiente.

En este periodo continúa la aplicación científica de la música como terapia, pero este uso no se hace de forma abierta hasta que se contrata a músicos para tocar en los hospitales de combatientes americanos de la primera guerra mundial. En la primera mitad del siglo XX, destaca Emille Jacques Dalcroze, quien decía que el organismo humano es susceptible de ser educado conforme al impulso de la música. Su método se basa en la unión de dos ritmos (musical y corporal). Karl Orff decía que en la creatividad unida al placer de la ejecución musical permitía una mejor socialización del individuo y un aumento de la confianza y la autoestima. En 1950 se funda en los Estados Unidos la “National Association for Music Therapy”, que se encarga de promover congresos y editar materiales, siendo los primeros en promover la carrera de musicoterapia en la universidad.

Se empiezan a crear asociaciones en otros países, entre ellos “Society for Music Therapy and Remedial Music” en Inglaterra, encabezada por Juliette Alvin. Esta sociedad se llama hoy “British Society for Music therapy”. A partir de estas asociaciones se crean otras como la “Asociación Italiana de Estudios de la Musicoterapia” y “Asociación Española de Musicoterapia” que se funda en

1974 pero no empieza a funcionar hasta 1976, su fundadora se llama Serafina Poch.

Este movimiento de asociaciones también llega a Sudamérica tras las primeras “Jornadas Latinoamericanas de Musicoterapia” en 1968, creándose asociaciones en países como Brasil, Uruguay, Perú o Argentina.

El primer “Congreso Mundial de Musicoterapia” se celebra en París en 1974. Desde entonces, el movimiento y desarrollo de la musicoterapia ha experimentado un gran crecimiento. Prueba de ello es la numerosa bibliografía que se está publicando al respecto.

(Jauset 2008).

Como disciplina formal, la musicoterapia es aún bastante joven. Las teorías están comenzando a tomar forma y la necesidad de investigación para sentar unas bases sólidas está empezando a ser cada vez más definida.

A lo largo de los últimos 50 años, se han hecho muchas afirmaciones en torno a los beneficios de estar expuesto a la acción de la música por su potencial de mejora cognitiva (Rickard *et al.* 2005). En el campo de la medicina, la música ha sido usada en numerosas ocasiones para potenciar la calidad de vida, reducir el estrés, y distraer a los pacientes de síntomas desagradables potenciando la sensación de bienestar y aliviando la disforia propia del enfermo.

El que se haya pensado en el sonido como vehículo de terapia puede tener diversos fundamentos. Todos tenemos, de forma consciente o no, la experiencia de que el sonido ejerce sobre nosotros un potente efecto emocional, es vehículo de imágenes y sensaciones que ayudan a establecer un vínculo con el entorno y con otras personas. Cada uno de nosotros somos una caja única de resonancia y las emociones que provoca la música son por ello distintas según la persona.

El sonido es también una señal de información que ayuda a insertarse en la vida real. Se constituye a modo de puente con la realidad, de referente del entorno, actuando como “correlato” que ayuda en la comprensión. Es estética, diversión, facilita la socialización y la respuesta física. La expresión musical y sus relaciones actúan como fuerzas dinámicas de cambio. Y es el hecho de poder transformarlo en algo sistemático con lo que poder interaccionar, lo que hace del sonido algo terapéutico.

Independientemente de las variaciones en cuanto a las preferencias personales, existe una interacción continua entre el componente físico de la música y sus efectos psicológicos y fisiológicos directos (Aldridge 1996) provocando cambios somáticos principalmente a través del Sistema Nervioso Autónomo (SNA). Ésta propiedad ha sido utilizada frecuentemente como elemento terapéutico coadyuvante de bajo coste para reducir la percepción del dolor agudo y/o crónico en los procedimientos médicos tradicionales, disminuyendo la ansiedad, mejorando la disposición a dichos procedimientos y potenciando además la calidad de vida de pacientes bajo cuidados paliativos al aportar sensación de confort y relajación. En este sentido, proporcionar musicoterapia a los cuidadores principales de personas enfermas es una estrategia eficiente para mejorar la empatía y la relación cuidador-enfermo sin interferir en los aspectos técnicos de su cuidado (Kemper & Danhauer, 2005).

La consideración sobre la función terapéutica de la música ha experimentado una rápida transformación en los últimos años.

Esta transformación se basa en investigaciones realizadas en el campo de la neurociencia, que trata de establecer los fundamentos neurobiológicos de la terapia musical al actuar sobre el aprendizaje y la inducción de cambios en las funciones cerebrales y el comportamiento animal y humano (Thaut 2005).

A través de estas investigaciones, la teoría y la práctica clínica de la musicoterapia va evolucionando desde un modelo de ciencia social basado en roles culturales y conceptos generales del bienestar, hacia un modelo científico

guiado por la neurociencia basado en la influencia concreta en las funciones cerebrales.

Este cambio paradigmático es necesario para hacer que la musicoterapia pase de ser considerada una modalidad complementaria de tratamiento, a ser una alternativa consolidada en rehabilitación y terapia (Thaut 2005).

1.3) Ámbito de aplicación

La musicoterapia desarrolla su actividad en diferentes áreas.

1.3.1) Área afectiva

- Favorecer la descarga emocional.
- Fomentar la expresión personal.
- Crear ambiente de seguridad.
- Facilitar la gratificación y la autoestima musicalmente.
- Reducir el nivel de ansiedad y tensión.

Tanto durante la infancia como en la etapa adulta, la música se ha usado con fines terapéuticos para reducir el estrés y el dolor en niños con trastornos del desarrollo o personas mayores con enfermedades neurológicas cuya comunicación verbal es limitada (Arabin 2002).

1.3.2) Área comunicacional y social

- Desarrollar la intención comunicativa.
- Desarrollar la comunicación, el contacto del paciente con lo que le rodea.

- En el caso de trabajar en grupo, favorecer la relación con otros miembros, promoviendo el sentimiento de pertenencia al grupo.

En un estudio cruzado realizado con niños con trastornos del desarrollo se observó que, en el grupo experimental, el trabajo a través de la musicoterapia mejoraba significativamente la interacción personal y social, la escucha y el discurso en comparación con el grupo control sin musicoterapia (Aldridge *et al.* 1995).

1.3.3) Área motriz

- Potenciar el movimiento voluntario y el control voluntario del movimiento.
- Trabajar la motilidad fina y gruesa a partir de actividades que estimulen la realización de actos motores voluntarios y la expresión corporal.

A lo largo de los últimos 15 años, diversos estudios muestran cómo el entrenamiento rítmico de las funciones motoras puede facilitar de manera activa la recuperación del movimiento en pacientes afectados con diferentes patologías. A continuación se resumen los trabajos más significativos.

a) Infarto cerebral (Thaut *et al.*, 1993; Hummelsheim 1999; Whitall *et al.* 2000; Mauritz 2002; Thaut *et al.*, 2002).

En 1997 Thaut *et al.* realizaron un estudio con pacientes que sufrieron un infarto cerebral hemiparético y que tenían dificultad a la hora de caminar. Quisieron determinar si el estímulo rítmico auditivo era una herramienta eficaz a la hora de apoyar la rehabilitación de estos pacientes. Para ello crearon dos grupos. Como grupo control eligieron a pacientes sometidos a un entrenamiento convencional de fisioterapia. El grupo experimental, en cambio, fue sometido a estímulos rítmicos auditivos. Ambos programas de entrenamiento se siguieron a lo largo de 6 semanas y, en ambos casos, se

analizó el proceso de mejora en el caminar valorando su velocidad de deambulación y su zancada dos veces al día. Los resultados obtenidos por estos autores, muestran que los pacientes pertenecientes al grupo experimental obtuvieron avances mucho más significativos que los pacientes sometidos a una terapia tradicional.

En 2002, estos mismos autores realizaron otro estudio en pacientes con la misma patología (Thaut *et al.* 2002). En este caso el objeto de estudio fue el efecto de estímulos rítmicos en la mejora del control espaciotemporal de los movimientos intencionales realizados con el brazo afectado (parético).

Para ello, crearon dos grupos de estudio. Los pacientes del grupo experimental fueron sometidos a estímulos rítmicos emitidos por un metrónomo mientras que los pacientes del grupo control no fueron tratados con esta técnica. Como parámetros valoraron la temporización del movimiento del brazo y las trayectorias trazadas hasta el alcance de objetos. Los resultados obtenidos por estos autores muestran que los pacientes pertenecientes al grupo experimental obtuvieron avances significativos para ambos parámetros.

b) Enfermedad de Parkinson (Miller *et al.* 1996; Thaut *et al.* 1996; McIntosh *et al.* 1997; Freedland *et al.* 2002; Pacchetti *et al.* 2000; Fernández & Cudeiro 2003).

En 2003, Howe *et al.* se plantearon investigar si el ajuste sistemático de estímulos auditivos se correspondía con modulaciones de los parámetros témporo-espaciales en la manera de caminar de pacientes en fase incipiente de la enfermedad de Parkinson. El estudio, llevado a cabo en un gimnasio de fisioterapia en Manchester, UK, contó con once personas en fase incipiente de la enfermedad de Parkinson que realizarían 15 series de deambulación a lo largo de 9 metros, siendo sus pasos dirigidos auditivamente o no (lo cual se asignó aleatoriamente). En su forma de caminar se valoró la cadencia, longitud de la zancada y velocidad de

deambulaci3n. Los resultados obtenidos les permitieron concluir que la frecuencia de los est3mulos auditivos pueden modular la cadencia y velocidad de la deambulaci3n en personas en fase incipiente de la enfermedad de Parkinson. Es decir, los est3mulos auditivos resultaban ser una estrategia positiva para mejorar la manera de caminar en estas personas.

c) Par3lisis cerebral (Thaut 1998) o da3o cerebral post traum3tico (Hurt 1998).

En 1998 Hurt *et al.* realizaron un estudio acerca de la estimulaci3n auditiva r3tmica ("RAS") a la hora de mejorar patrones de deambulaci3n en 8 personas con da3o cerebral post traum3tico. Los pacientes (5 hombres y 3 mujeres de entre 25 y 35 a3os) presentaban des3rdenes deambulatorios a los 4-24 meses del da3o cerebral. A lo largo del entrenamiento con estimulaci3n auditiva r3tmica, la velocidad y simetr3a de la zancada mejoraron en un 18% de media. Y, tras 5 semanas de entrenamiento diario, 5 pacientes incrementaron su velocidad media ($p \leq .05$) en torno al 51% (38.8 m/min a 57.6 m/min.; $p \leq .43$). La cadencia (+16%) y longitud de la zancada (+29%) experimentaron as3 mismo mejoras significativas, no as3 la simetr3a de la zancada que mejor3 en un 12%.

As3 mismo, existen estudios que corroboran los beneficios del uso de la m3sica en la rehabilitaci3n del habla (Pilon 1998; Thaut 2001; Boucher 2001; Bonakdarpour 2003; Belin 1996). El canto est3 estudiado como mecanismo que estimula y da fluidez por reducir la velocidad del habla, al memorizarse el material hablado y reducirse su contenido, todo ello enmarcado por un ritmo dado. Estas afirmaciones verificadas en 1996 por Glover en un estudio realizado con 12 personas tartamudas instruidas para leer o cantar 4 pasajes diferentes bajo las siguientes condiciones: leer a velocidad normal, leer a gran velocidad, cantar a velocidad normal, cantar a gran velocidad. Los hallazgos mostraron que las personas tartamudas son capaces de generar una fluidez interna del habla si se imponen una estructura mel3dica propia.

En definitiva, la musicoterapia fomenta la mejora de la calidad de vida de las personas teniendo cabida dentro de una atención multidisciplinar de la salud.

2. MÚSICA

En este punto abordaremos el concepto e implicaciones de la música por ser la herramienta de intervención en musicoterapia y uno de los pilares en torno a los que gira esta investigación. En primer lugar, daremos diversas definiciones que existen del concepto “música” y de los elementos en los que se puede desglosar. Seguidamente, hablaremos del aspecto psicológico y físico de la música y por último del sonido y sus propiedades.

2.1) Definición

La **música** (del griego: μουσική [τέχνη] - *mousikē [téchnē]*, "el arte de las musas") es, según la definición tradicional del término, el arte de organizar sensible y lógicamente una combinación coherente de sonidos y silencios utilizando los principios fundamentales de la melodía, la armonía y el ritmo, mediante la intervención de complejos procesos psíquico-anímicos.

El concepto de música ha ido evolucionando desde su origen en la antigua Grecia (en que se reunía sin distinción a la poesía, la música y la danza como arte unitario) hasta el punto de que, en la actualidad, el definir qué es y qué no es la música se ha vuelto más complejo. Destacados compositores, en el marco de diversas experiencias artísticas fronterizas, han realizado obras que, si bien podrían considerarse musicales, expanden los límites de la definición de este arte (Kivi 2001).

El sentido de las expresiones musicales se ve afectado por cuestiones psicológicas, sociales, culturales e históricas. De esta forma, surgen múltiples y diversas concepciones, que pueden ser válidas en el momento de expresar qué se entiende por música.

Las ideas de los antiguos filósofos griegos concuerdan con las especulaciones de los eruditos en la época medieval, estudiando y definiendo a la música como un conjunto de tonos ordenados de manera horizontal (melodías) y vertical (armonía). Este orden o estructura que deben tener un grupo de sonidos para ser llamados música está, por ejemplo, presente en las aseveraciones del filósofo alemán Goethe cuando la comparaba con la arquitectura, definiendo a la última como "música congelada". La mayoría coincide en el aspecto de la estructura, pero algunos teóricos modernos difieren en que el resultado deba ser placentero o agradable (Trías 2007).

Según el compositor Claude Debussy (1862-1918), la música es "*un total de fuerzas dispersas expresadas en un proceso sonoro que incluye: el instrumento, el instrumentista, el creador y su obra, un medio propagador y un sistema receptor*".

Una definición bastante amplia determina que música es "*sonoridad organizada*" (según una formulación perceptible, coherente y significativa). Esta definición parte de que se pueden percibir ciertos patrones del "flujo sonoro" en función de cómo las propiedades del sonido son aprendidas y procesadas por los humanos (hay incluso quienes consideran que también por los animales).

Hoy en día es frecuente trabajar con un concepto de música basado en tres atributos esenciales: que utiliza sonidos (punto de vista físico), que es un producto humano (punto de vista psicológico) y que en ella la función estética es importante (punto de vista artístico), (Michels 1985).

2.2) Elementos

La organización coherente de los sonidos y los silencios (según una forma de percepción) nos da los elementos fundamentales de la música, que son la melodía, la armonía y el ritmo. La manera en la que se definen y aplican estos principios, varían de una cultura a otra y de una época a otra.

- El ritmo se define como la organización en el tiempo de pulsos y acentos, de forma que los oyentes perciben una estructura. Esta sucesión temporal se ordena en nuestra mente, que registra de éste modo una forma.

- La melodía es un conjunto de sonidos, concebidos dentro de un ámbito sonoro particular, que suenan sucesivamente uno después de otro (concepción horizontal), y que se percibe con identidad y sentido propio. También los silencios forman parte de la estructura de la melodía, permitiendo pausas al "discurso melódico". El resultado es comparable a una frase semántica y gramaticalmente bien construida.

- La armonía, bajo una concepción vertical de la sonoridad y cuya unidad básica es el acorde, regula la concordancia entre sonidos que suenan simultáneamente y su enlace con sonidos vecinos.

- El pulso se puede definir como la unidad temporal básica (aun así divisible) de una obra musical. Al igual que los ritmos en la naturaleza, el ritmo musical suele organizarse en patrones de recurrencia regular. La igualdad repetitiva que proporciona el pulso configura la estructura en la que se fundamenta la rítmica musical. Dichos patrones de recurrencia controlan el movimiento de la música y ayudan al oído humano a comprender su estructura, a pesar de que en ocasiones el pulso no se manifieste como sonido sino como silencio.

(Copland 1994).

2.3) La música como fenómeno psicológico

La música, como toda manifestación artística, es un producto cultural. El fin de este arte es suscitar una experiencia estética en el oyente y expresar sentimientos, circunstancias, pensamientos o ideas. La música es un estímulo que afecta el campo perceptivo del individuo, así el flujo sonoro puede cumplir con variadas funciones (entretenimiento, comunicación, ambientación, etc.) (Del Campo *et al.* 1997).

Todas las culturas tienen manifestaciones musicales que se dan incluso en los animales. Se ha demostrado que las ballenas se comunican gracias a un lenguaje sonoro que podríamos llamar musical, al igual que la mayoría de las aves, lo que sugiere un posible origen filogenético común.

La música está ligada a un grupo social y a sus acontecimientos, siendo expresión de éstos últimos. Dichos acontecimientos no son universales; en este sentido no podemos decir que la música sea universal, por lo menos en cuanto a su contenido, significado e interpretación.

Por ejemplo, es probable que las obras de Beethoven carezcan de sentido musical para un indígena, quien entiende la música a partir estructuras psíquicas diferentes a las del mundo occidental.

Muchos piensan, en cambio, que la música sí es un lenguaje universal por el hecho de que varios de sus elementos, como la melodía, la métrica y, especialmente, la armonía (relación entre las frecuencias de las diversas notas de un acorde), son el resultado de un orden y unas determinadas proporciones matemáticas (hecho que ya fue puesto de relieve por Pitágoras) que los humanos percibimos como bellas.

El compositor (creador de música) delega en el intérprete (emisor) la ejecución de sus obras quien, en ocasiones, transmite en la música

determinados hechos y sentimientos personales a través de una secuencia de sonidos. También existen culturas musicales que no tienen en cuenta la separación occidental entre creador/intérprete, ya que en ellas la música se ejecuta principalmente de manera improvisada (creador e intérprete son, en este caso, la misma persona).

La música es, en general, un vehículo de expresión proveedor de emociones, comunicación, recuerdo, fantasía. Es estética, diversión, facilita la socialización y la respuesta física. La expresión musical y sus relaciones actúan como fuerzas dinámicas capaces de inducir cambios físicos y psíquicos.

2.4) La música como fenómeno físico

La música es, desde el punto de vista físico, un conjunto de sonidos en combinación con el silencio. El sonido ha estado siempre presente en la vida cotidiana del hombre que, inventando una serie de reglas para ordenarlo, ha ido elaborando algún tipo de lenguaje musical por un lado y oral por otro. El sonido es generado por una fuente vibratoria provocando el desplazamiento de moléculas (Arabin 1998).

En física, sonido es una onda mecánica longitudinal, generada por el movimiento vibratorio de un cuerpo, que se propaga en un medio elástico. La propagación del sonido implica transporte de energía, sin transporte de materia, en forma de ondas mecánicas que se propagan a través de la materia sólida, líquida o gaseosa. Como las vibraciones se producen en la misma dirección en la que se propaga el sonido, se trata de una onda longitudinal.

En los cuerpos sólidos la propagación del sonido involucra variaciones del estado tensional del medio. La propagación del sonido es similar en los fluidos, donde el sonido toma forma de fluctuaciones de presión.

Ciertas características de los fluidos y de los sólidos influyen en la onda de sonido. La densidad es un factor importante en la velocidad de propagación. En general, cuanto mayor sea la densidad (ρ), a igualdad de todo lo demás, tanto menor es la velocidad de la propagación del sonido (v). La velocidad del sonido se relaciona con esas magnitudes mediante:

$$v \propto \sqrt{\frac{K}{\rho}}$$

En los gases, la temperatura influye tanto la compresibilidad como la densidad, de tal manera que el factor de importancia suele ser la temperatura misma. En general, cuanto mayor sea la compresibilidad ($1/K$) del medio, tanto menor es la velocidad del sonido.

Es por lo mencionado anteriormente, que el sonido se propaga en los sólidos y en los líquidos con mayor rapidez que en los gases.

Como todo movimiento ondulatorio, el sonido puede representarse como una suma de curvas sinusoides con un factor de amplitud, que se pueden caracterizar por las mismas magnitudes y unidades de medida que a cualquier onda de frecuencia bien definida. Estas magnitudes son: longitud de onda (λ), frecuencia (ν) o inversa del período (T). La amplitud es el valor máximo respecto del equilibrio que toma la onda, siendo la cantidad de energía contenida en una señal sonora dependiente del valor de dicha amplitud, diferente de volumen o potencia acústica. Finalmente, cuando se considera la superposición de diferentes ondas, es importante la fase que representa el retardo relativo en la posición de una onda con respecto a otra.

$$\Phi = \Phi_{\max} \cdot \cos(\omega t + \alpha)$$

Esta es la ecuación general de una onda, donde Φ_{\max} es la amplitud, ω la frecuencia y α la fase. Cualquier sonido se puede descomponer

matemáticamente en una suma de funciones de onda, cada una con esos tres parámetros distintos.

Si hablamos de sonidos complejos, su caracterización implica analizar tanto la energía transmitida como la distribución de dicha energía entre las diversas ondas componentes, para lo que resulta útil conocer:

- **Potencia acústica:** El nivel de potencia acústica es la cantidad de energía radiada en forma de ondas por una fuente determinada en una unidad de tiempo. La potencia acústica depende de la amplitud.
- **Espectro de frecuencias:** que permite conocer en qué frecuencias se transmite la mayor parte de la energía.

(Iglesias 2004)

Propiedades del sonido

Las cuatro cualidades básicas del sonido son (Copland 1994):

- **Altura:** determinada por la frecuencia fundamental de las ondas sonoras (es lo que permite distinguir entre sonidos graves, agudos o medios) y medida en ciclos por segundo o hercios (Hz). En el caso de los humanos, para que el sonido pueda ser percibido, éste debe estar comprendido entre el rango de audición de 20 y 20.000 Hz. A esto se le denomina rango de *frecuencia audible*. Con los años este rango va reduciéndose tanto en graves como en agudos. Por debajo de este rango tenemos los infrasonidos y por encima los ultrasonidos, percibidos sólo por algunos animales.

- **Intensidad:** cantidad de energía acústica que contiene un sonido. La intensidad viene determinada por la potencia, que a su vez está determinada por la amplitud y nos permite distinguir si el sonido es fuerte o débil. Los sonidos que percibimos deben superar el umbral auditivo (0 dB) y no llegar al

umbral de dolor (140 dB). Esta cualidad la medimos con el sonómetro y los resultados se expresan en decibelios (dB).

- **Timbre:** cualidad conferida al sonido por los armónicos que acompañan a la frecuencia fundamental. Esta cualidad es la que permite, por ejemplo, distinguir entre dos sonidos que representan la misma nota (tono) con igual intensidad, producidos por dos instrumentos musicales distintos. En el caso humano, al menos, distinguimos un instrumento de otro por lo que denominamos el “ataque”, la intensidad y frecuencias al comienzo de cada “nota”, inherente a cada fuente sonora. El ataque se percibiría claramente si reprodujésemos la música al revés, ya que en ese caso nos sonaría muy extraña debido a que el sonido comenzaría intenso para amortiguarse después.

- **Duración:** cualidad que determina el tiempo de vibración de un objeto. Podemos así clasificar los sonidos que escuchamos como sonidos largos, cortos, muy cortos, etc.

3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA MÚSICA SOBRE ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS

Los estudios realizados sobre las bases neurobiológicas del mecanismo de acción de la música sugiere que ésta es capaz de influenciar y modelar las funciones cerebrales. El cerebro que se encuentra bajo la influencia de la música sufre una transformación en su actividad. Esta relación recíproca entre música y función cerebral se descubrió a lo largo de los últimos 10 años al interconectar campos como los de neurociencias, teoría de la música, musicoterapia o rehabilitación (Thaut 2005).

3.1) Estudios en pacientes

Con todo ello, sin embargo, la cuestión a cerca de cuáles son los mecanismos que puedan explicar la acción de la música (y por ende de la musicoterapia) en el hombre, permanece aún sin responder (Hillecke *et al.* 2005; Nickel *et al.* 2005).

Diversos ámbitos teóricos sustentan la acción de la música como pluridimensional al poder considerársele como un fenómeno cultural, estético, psicológico y físico. Habitualmente, el valor terapéutico de la música se viene explicando de manera fundamental por su rol cultural, al facilitar el aprendizaje de habilidades sociales y el bienestar emocional (Pfund 2000; Gold *et al.* 2004; Kim S *et al.* 2006; Jauset 2008). Pero recientes investigaciones apuntan a la capacidad de la música de estimular en el cerebro complejos procesos cognitivos, afectivos y sensorio-motores (Thaut 2005).

En este sentido, el estudio realizado por Chen *et al.* en 1994 en China, demostró que niños expuestos a estímulos musicales durante el embarazo y el periodo neonatal evaluados por la “Escala infantil Gesell” desarrollaron más tempranamente algunas habilidades como sentarse, estar de pie y caminar, en comparación con los niños del grupo control, realizándose estas observaciones entre 5 y 12 meses después del parto. En todo caso, la gran mayoría de los estudios concluyentes que se han llevado a cabo hasta la fecha, adjudican al mecanismo de acción de la música unas propiedades terapéuticas sobre el S.N.C. basadas en la intervención de la psique del individuo, al considerarse la música como un fenómeno abstracto y psicológico (Dush *et al.* 1989; Layman *et al.* 2002; Vink *et al.* 2004; Whipple 2004; Keen 2004; Raina *et al.* 2005; Sung y Chang 2005; Dileo 2006; Erkkilä *et al.* 2008; Maratos *et al.* 2008).

Sin embargo existen algunos precedentes, como veremos en el apartado 3.2), que consideran a la música como un fenómeno físico capaz de actuar directamente sobre el comportamiento neuronal y ejercer modificaciones en el

mismo, argumentando así la existencia de efectos directos de la música sobre los tejidos y estructuras biológicas.

Estudios como el de Cowless *et al.* en 2003, relativos a trastornos de la memoria como la Enfermedad de Alzheimer, muestran que la retención de información musical se prolonga en el tiempo sin mostrar proporción con el estado concurrente de pérdida de memoria de la persona.

Estos datos sugieren que las vías neurológicas de la memoria musical son más estables y su resistencia a las influencias neurodegenerativas es mayor (Foster & Valentine, 2001; Haslam & Cook 2002). Esta posibilidad de rescatar la memoria es una de las principales estrategias de la musicoterapia ante enfermedades neurodegenerativas.

Otros estudios como el de Conrad *et al.* en 2007 demuestran que, comparado con un grupo control, la aplicación de música (en este caso movimientos lentos de sonatas para piano de Mozart) reduce significativamente la cantidad de fármacos de acción sedativa necesarios para alcanzar un nivel similar de sedación en pacientes críticos. En este mismo estudio, los autores observan que, en los pacientes sometidos a los estímulos musicales, se detecta un incremento en sangre de los niveles de la hormona de crecimiento y una reducción de los niveles de interleukina-6 y epinefrina. El descenso detectado de los niveles sistémicos de hormonas del estrés se asoció con un nivel significativamente más bajo de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca. El grupo de investigación de Conrad propone así una vía neurohormonal por la que la música podría ejercer su efecto sedativo. Este modelo incluye una interacción entre el eje hipotalámico-pituitario y la médula adrenal a través de mediadores del sistema inmune inespecífico.

Por otra parte, estudios neurofisiológicos han mostrado que el sonido puede excitar las moto-neuronas espinales mediante conexiones auditivo-motoras a nivel del tronco cerebral y la médula espinal (Rossignol & Jones 1976).

3.2) Experimentación animal

Por otro lado, existen estudios que demuestran que la música es capaz de producir cambios específicos en la expresión de determinadas moléculas y el proceso de neurogénesis.

En este sentido, el grupo de investigación de Wadhwa lleva a cabo en 1999 un estudio sobre la plasticidad del núcleo auditivo de pollo (*gallus domesticus*) en condiciones de atenuación sonora prenatal y sobreestimulación con reclamos y estímulos musicales. Se separa a la población en tres grupos.

Exponen a un primer grupo a un sonido de sitar (sonido continuo a 65dB, entre 100-4000hz) durante 15 minutos cada hora en un plazo de 24 horas. Someten a un segundo grupo a reclamos específicos de la especie (sonido discontinuo a 65dB, 100-6300Hz) en las mismas condiciones. Consideran al tercer grupo como control. Posteriormente, anestesian los embriones y los decapitan en diferentes momentos del desarrollo embrionario (HH38, HH42, HH46) y 1ph (post hatching, tras la eclosión). Fijan el cerebro en paraformaldehído al 4% y 4°C durante dos semanas. Mediante el microscopio de Zeiss a un aumento de 40x realizan contajes de las neuronas observándose un aumento de la neurogénesis (40% de neuronas más en el grupo música y reclamo) en el núcleo auditivo (Wadhwa *et al.*, 1999).

El grupo de investigación de Alladi realiza un estudio en el núcleo auditivo de pollo blanco "Leghorn" (*gallus domesticus*) sometiéndoles a diferentes condiciones acústicas para determinar las consecuencias en el desarrollo del perfil de proteínas sinápticas: sinaptofisina y syntaxina-1 asociadas a una mayor potencia de sinapsis. Para ello emplean un grupo control (sonido del incubador 100-180 Hz, 40 dB) y dos grupos estimulados, uno con reclamos específicos de especie (100-6300 Hz, 65dB) y el otro con música de sitar (100-4000 Hz, 65dB). En ambos casos, la estimulación se

realiza desde el estadio 36 de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton 1951) (HH-36) hasta el primer día post eclosión (1ph) durante 15 minutos cada hora. Mediante las técnicas de inmunohistoquímica e inmunoblotting del cerebro se valora la localización de la syntaxina-1 y sinaptofisina en el núcleo auditivo, sacrificando a 12 embriones en cada una de las fases: HH38, HH42, HH46 y 1ph. Esto revela un aumento de dichas proteínas durante el primer periodo embrionario en los grupos estimulados auditivamente (Alladi *et al.* 2002).

El mismo grupo plantea en idénticos grupos experimentales y con similar metodología, que el enriquecimiento sonoro prenatal con reclamos y sonido de sitar modula la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis, alterando dicho proceso en el núcleo auditivo de pollo. Emplean la técnica inmunohistoquímica de T.U.N.E.L. para la detección de células apoptóticas, e inmunoblotting para cuantificar la expresión de la proteína BCL2 y Bax. Encuentran que aumento de la actividad neuronal favorece la supervivencia neuronal al producirse una atenuación de la muerte celular relacionada con una disminución de la expresión de proteínas apoptóticas (menor vulnerabilidad a estímulos citotóxicos) en los grupos estimulados sonoramente (Alladi *et al.* 2005).

También con el mismo diseño experimental, el grupo de Panicker (2002) investiga el efecto del estímulo sonoro prenatal en la morfología de neuronas de la zona ventral del cerebro de pollo blanco “Leghorn” (*gallus domesticus*) relacionadas con la impronta filial auditiva. Este grupo plantea que el aumento del número de neuronas con proteínas fijadoras de calcio podría ser la base morfológica del proceso de impronta y aprendizaje auditivo. Por ello evalúan también la expresión de proteínas fijadoras de calcio (CaBP y PV) reguladas por activación neuronal, observando un aumento significativo del tamaño nuclear neuronal y del número de neuronas fijadoras de Ca^{2+} en la zona ventral cerebral, lo que se relaciona con la mejora en el aprendizaje (Panicker *et al.* 2002).

En este mismo sentido, un estudio reciente (2006) realizado por el grupo del Dr. Chikahisa expone a un grupo de ratones a ruido blanco (70 dB) y a otro a música de Mozart (65-75 dB) durante 12h al día los últimos 7 días de desarrollo intrauterino y los 60 primeros días post parto, tomando un tercer grupo de ratones expuestos a “silencio” (55 dB) como control. A continuación someten a los ratones adultos a un proceso de aprendizaje midiendo sus tiempos de carrera y errores cometidos. Posteriormente se valora en secciones cerebrales congeladas en hielo seco y a -80°C el nivel de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su receptor tirosinkinasa B (TrkB). Encuentran que, los ratones adultos que en su periodo embrionario fueron expuestos a estímulos musicales, muestran una mejora en el aprendizaje relacionada con un incremento en el número de los TrkB en el córtex cerebral. Aclaran también que no se trata de la evidencia biológica del “efecto Mozart” puesto que sólo evaluaron la respuesta a la música de Mozart sin comparar los resultados con los que se obtendrían empleando otro tipo de música (Chikahisa *et al.* 2006).

Paralelamente, en 2006, el grupo del Dr. Kim realiza un estudio en ratas sobre la influencia de la exposición prenatal a ruido o a música en comparación con un grupo control sobre la memoria espacial y la actividad neurogénica en el hipocampo de fetos de ratas. Para ello emplean tres grupos de ratas Sprague-Dawley a las que exponen a los estímulos sonoros desde el día 14 al día 21 de gestación. Someten a uno de los grupos a ruido (95 dB) y a otro a música (65 dB), en ambos casos durante una hora al día, considerándose un tercer grupo no sometido a estímulos sonoros como grupo control. A cada uno de los grupos se le inyecta 100 mg de BrdU subcutánea al día 30 minutos antes de la exposición sonora. Al nacimiento, se realiza un entrenamiento que se repite en tres ocasiones antes de pasarles el test “Brazoradial Maze Test” para valorar su memoria espacial. Posteriormente, se procesa el cerebro de las ratas participantes practicándoles secciones coronales de 40µm sobre las que se realiza la técnica inmunohistoquímica de BrdU para detectar nuevas células en el giro dentado. Se cuantifica el número de células por mm².

Los resultados concluyen que, en el grupo expuesto a música, hay un aumento del número de neuronas por mm^2 , así como un mayor número de aciertos antes del primer fallo en el test. Por otro lado, el ruido prenatal retrasa el crecimiento, disminuye la neurogénesis y altera el aprendizaje espacial (Kim H *et al.* 2006).

4. NEUROEPITELIO

En nuestro estudio trabajamos con cerebro en etapas tempranas del desarrollo, en las que se encuentra constituido por neuroepitelio. Es por ello que comentaremos a continuación las características fundamentales del mismo.

4.1) Formación y maduración

En las fases más tempranas del desarrollo del SNC, la neurulación conduce a la formación de una estructura denominada tubo neural, en la que destaca un extremo cefálico dilatado que dará lugar al encéfalo adulto. El tubo neural está constituido por una pared de células a cuyo conjunto denominamos neuroepitelio. Las células del neuroepitelio presentan una clara polarización apico-basal, de forma que sus superficies apicales delimitan una gran cavidad repleta del denominado fluido cerebroespinal embrionario (E-CSF). En la fase de maduración del neuroepitelio, los procesos de replicación y diferenciación neural y glial de las células madre neuroepiteliales dependen de la acción combinada de diferentes citoquinas y factores de crecimiento. Dicho proceso de neurogénesis es particularmente activo en el neuroepitelio del esbozo cerebral. Algunas de las células madre, posiblemente por un reparto diferencial de proteínas (Notch 1 y Numb) salen del ciclo mitótico y se diferencian en neuroblastos o células madre de estirpe neural (Wolpert 1998).

4.2) Factores de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Como se ha mencionado, todo el proceso de replicación y diferenciación de las células madre del neuroepitelio, tanto en sentido neuronal como glial, es dependiente de la acción combinada de diferentes citoquinas y factores de crecimiento que generan un equilibrio entre estímulos activadores e inhibidores de las diferentes rutas de migración (Kalyani and Rao 1998, Rao 1999).

La familia de los FGFs está compuesta hasta el momento por 23 miembros (FGF-1 a 23). Son multifuncionales y se ha demostrado su influencia en la migración celular, el neurotrofismo y la diferenciación celular (Burgess y Maciag, 1989; Galzie et al. 1997; Naski y Ornitz, 1998; Carnicero 2001) .

Están implicados en multitud de procesos fisiológicos como la neovascularización y la reparación de lesiones tisulares, además de ser inductores de procesos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario y fetal. Son mitogénicos para una amplia variedad de tipos celulares, incluyendo los epiteliales, mesodermales y neuronales. Su expresión sigue un estricto patrón temporal durante el desarrollo embrionario (Carnicero 2001). En el caso del control del proceso de replicación y neurogénesis de las células madre neuroepiteliales hay dos factores de crecimiento que parecen jugar un papel fundamental, el FGF-2 y el EGF. El FGF-2 es considerado como un potente mitógeno de las células madre del neuroepitelio en diferentes especies animales (Kalsheim and Neufeld 1990; Ghosh and Greenberg 1995; Kalyani *et al.* 1999; Martin *et al.* 2006) y se sabe que estas células expresan receptores tanto para FGF-2 como para EGF (Kalsheim and Neufeld 1990, Kalyani *et al.* 1999).

Los FGFs se unen a dos tipos de receptores: los receptores de alta afinidad (FGFR) y los de baja afinidad (HLGAG) (Carnicero 2001; Gato & Desmond 2009). Por otra parte, el FGF-2 ha sido relacionado no sólo con el proceso de replicación de células madre, sino que también se le considera

capaz de activar el proceso de neurogénesis cortical durante el desarrollo embrionario (Vaccarino *et al.* 1999; Raballo *et al.* 2000) fetal (Dono *et al.* 1998) y en las regiones cerebrales del adulto que están en contacto directo con el CSF de los ventrículos (Hipocampo y Zona Subventricular) en roedores y humanos (Craig *et al.* 1996; Weiss *et al.* 1996; Kuhn *et al.* 1997; Vaccarino *et al.* 1999, Raballo *et al.* 2000; Vescovi *et al.* 2001; Alvarez-Buylla and García-Verdugo 2002; Sawamoto *et al.* 2006).

La teoría actual mas aceptada es que existen dos poblaciones de células madre en el neuroepitelio. Una de aparición mas temprana, cuyo proceso de replicación y neurogénesis depende de la acción del FGF-2 y otra de aparición mas tardía, cuyo proceso de replicación y neurogénesis depende de la acción del EGF (Tropepe *et al.* 1999, Martens *et al.* 2000).

En la actualidad, se considera que el proceso de diferenciación de la célula progenitora hasta neurona funcionando depende de la acción combinada y secuencial de distintos factores y morfógenos (Panchision and McKay 2002).

5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Como venimos argumentando, diferentes estudios científicos experimentales en distintas especies (aves y mamíferos) sugieren que la música podría ejercer una influencia directa sobre el comportamiento de células del S.N.C. Sin embargo existen pocos estudios que confirmen este dato y clarifiquen qué tipo de influencia ejerce la música, sobre qué células, a través de qué mecanismos celulares y cuál es la consecuencia de dicha influencia.

Por ello nos planteamos estudiar la posible existencia de una relación directa y causal entre la música y el comportamiento celular en un sistema de

cultivos celulares que, por su simplicidad y estandarización, nos permita apreciar la existencia de resultados directos. Estos datos podrían abrir una vía de conocimiento sobre cómo la musicoterapia está influyendo en las personas, pudiendo ser considerada como una terapia de aplicación coadyuvante en patologías humanas (Rickard *et al.* 2005).

6. HIPÓTESIS

La música ejerce un efecto sobre el S.N.C. no sólo a través de vías psicológicas, sino que también podría hacerlo mediante una acción directa sobre el comportamiento celular.

7. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

La existencia de una capacidad de influencia directa de la música sobre el comportamiento celular permitiría explicar y profundizar en el conocimiento de los efectos terapéuticos de la música.

En nuestro estudio nos planteamos establecer la existencia de dicha relación directa y causal entre la música como fenómeno físico y el comportamiento de células del SNC. Para ello, y basándonos en la experiencia del equipo investigador del Laboratorio del Desarrollo y Teratología del SNC del INCYL (departamento de Anatomía y Radiología de la UVA), pretendemos desarrollar un modelo de cultivo *in vitro* de precursores neuroepiteliales de cerebro de embrión de ratón de E11.5 días de desarrollo como modelo simple,

altamente sensible a la acción de efectos externos y de comportamiento fácilmente valorable, para tratar de esclarecer si existe dicha relación música-comportamiento celular, tipificando y cuantificando dicho efecto.

Objetivo general

Determinar si el sonido como fenómeno físico tiene un efecto directo sobre el comportamiento celular, utilizando para ello un cultivo *in vitro* de células madre de mesencéfalo embrionario de ratón.

Objetivos específicos:

1. Determinar si el efecto obtenido está en función de la organización armónica estructural de los sonidos, utilizando para ello, como condiciones experimentales, silencio, música y ruido.
2. Valorar y cuantificar el efecto en base al estudio del comportamiento celular mediante la evaluación del grado de supervivencia.
3. Valorar y cuantificar el efecto en base al estudio del comportamiento celular mediante la evaluación del grado de replicación.
4. Valorar y cuantificar el efecto en base al estudio del comportamiento celular mediante la evaluación del grado de diferenciación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

1.1) Obtención de embriones de ratón (11,5 días p.c.)

Los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron emplazados en un animalario, sometidos a un ciclo alternante de luz oscuridad controlado (14/10h) y en unas condiciones óptimas de temperatura (20-24°C) y humedad (45-55%). Estas condiciones ambientales facilitan la estabilidad de los biorritmos de los animales, mejorando sensiblemente los resultados del apareamiento.



Fig.1. Ratonas preñadas 11,5 días p.c.

La técnica de apareamiento es importante para controlar el grado de desarrollo embrionario con la mayor exactitud posible.

Por ello se trasladan tres hembras a la jaula del macho al inicio del ciclo de oscuridad y 12-14 horas después se separa a los machos y se determina la preñez por la presencia del denominado “tapón vaginal”.

Las hembras que presentan dicho tapón, se consideran preñadas y se separan (Fig.1), anotando como hora de inicio del desarrollo embrionario las 0 horas de la noche anterior; el grado de desarrollo se expresa en días y horas *post coitum* (p.c.) desde ese momento.

Transcurrido el tiempo de gestación previsto, 11,5 días p.c., se procede a la obtención de los embriones. Para ello se anestesia a la hembra preñada mediante inhalación de éter etílico hasta comprobar la pérdida de mecanismos reflejos y la relajación muscular.



Fig.2. Material de extracción del útero



Fig.3. Laparotomía ventral media

Posteriormente se realiza una amplia laparotomía media (Fig.2 y 3) y se identifica y separa el útero bicorne de su meso para comprobar la presencia de embriones en desarrollo.

El útero grávido adquiere el aspecto de un “collar de cuentas” (Fig.5) en el que cada abultamiento se corresponde con el lugar de implantación de un embrión. Se extirpa el útero separándolo de la vagina y el peritoneo e inmediatamente después se sacrifica a la madre por dislocación cervical.



Fig.4. Lupa

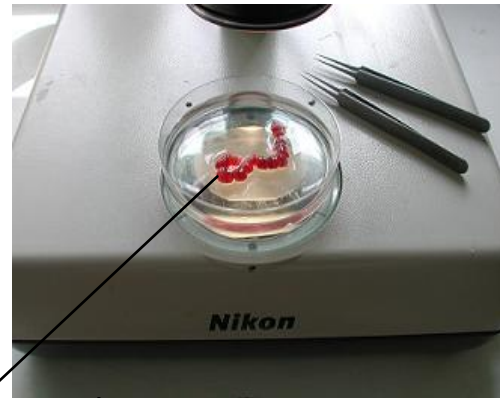


Fig.5. Útero en “collar de cuentas”

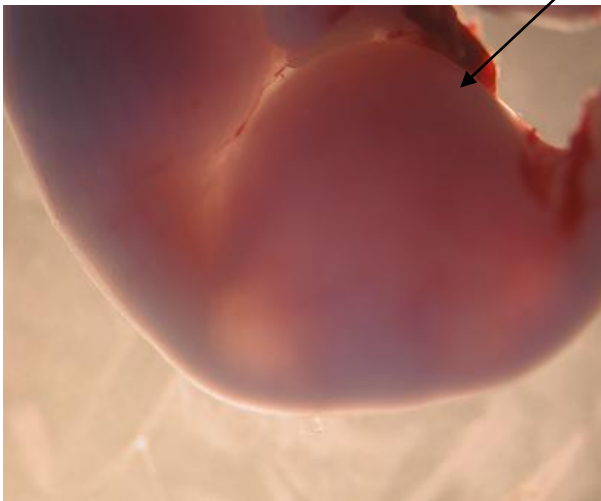


Fig.6. Engrosamiento uterino



Fig.7. Embrión 11,5 días p.c.

Cada uno de los engrosamientos uterinos (Fig.6) se aísla con micro tijeras en una placa con solución Ringer (120 mM ClNa; 5,36 mM ClK; 1,63 mM Cl₂Ca pH 7.3) a 4°C.

Posteriormente, por micro disección y bajo la lupa (Fig.4), a cada engrosamiento uterino se le retira el miometrio y el endometrio, dejando al descubierto el embrión envuelto en las membranas vitelina y amniótica las cuales se rasgan cuidadosamente. Por último, se corta la unión vascular a la placenta.

Una vez liberados los embriones se procede a clasificarlos según su grado de desarrollo mediante una serie de parámetros morfológicos descritos por Brown y Fabro (1981), que diferencian precisamente la edad del embrión.

Solamente hemos utilizado en este estudio los embriones que alcanzan el estadio de desarrollo requerido, 11,5 días p.c. (Fig.7).

1.2) Realización de cultivo de células madre de mesencéfalo de ratón (11,5 días p.c.)

1.2.1) Obtención de neuroepitelio mesencefálico

Tras seleccionar entre 10 y 12 embriones en el estadio de interés (11,5 días p.c.), se procede a eliminar el ectodermo de superficie en la porción dorsal del mesencéfalo utilizando agujas de tungsteno (Fig.8).

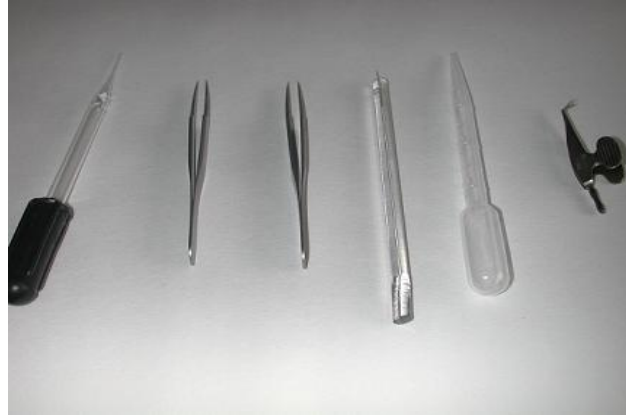


Fig. 8. Material para la obtención del mesencéfalo

Una vez eliminado el ectodermo se procede a la disección, empleando unas micro tijeras, de la parte dorsal del mesencéfalo de cada uno de los embriones. A continuación, todos los fragmentos mesencefálicos (Fig.9) se pasan a una placa nueva y se lavan 3 veces en Ringer frío. Se recogen, se pasan a un tubo eppendorf que contiene 500 μ l de Ringer frío y se disocian mecánicamente con una pipeta pasteur estéril flameada (6-8 pases). Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C (Fig.10).



Fig.9. Mesencéfalo dorsal de embrión 11,5 días p.c

Se retira el sobrenadante y el pellet celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo (DMEM + 6% FBS + 6% HS + 1% L-Glutamina + 1% Penicilina/Streptomycin).

Posteriormente, se procede a contar en un hemocitómetro el número de células viables (valorando las células no viables por su capacidad de teñirse con Trypan Blue 0.4%) y se siembran en placas de Petri (Fig.11) a una concentración de 2×10^6 células/100mm² añadiendo como factor mitogénico FGF-2 recombinante (20ng/ml) cada 48h. Con el fin de que el cultivo se estabilice, las placas de Petri sembradas fueron mantenidas durante 8 días a 37°C, con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%.



Fig.10. Centrifuga

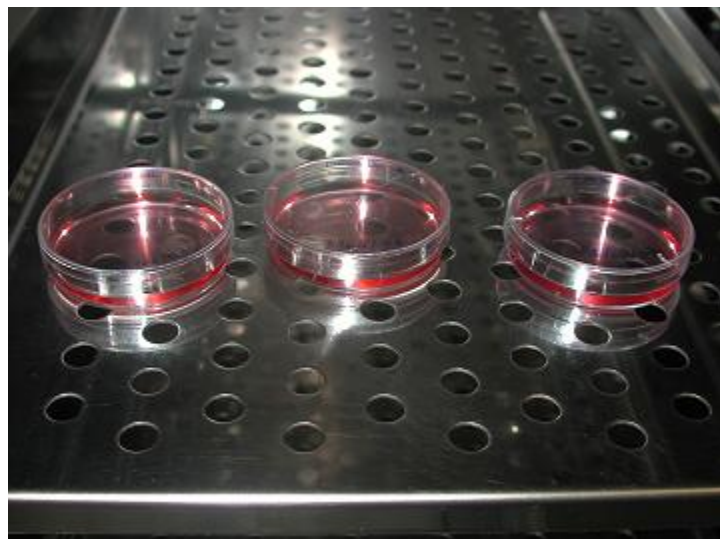


Fig.11. Placas de Petri con cultivo celular

1.2.2) Resiembra de células y cultivo

Una vez transcurridos 8 días en cultivo, se procede a la resiembra de las células mesencefálicas sobre cubreobjetos de 13mm de diámetro dispuestos en placas de cuatro pocillos.

Con el fin de facilitar la adhesión celular, los cubreobjetos fueron previamente tratados con poli-D-lisina (100 $\mu\text{g/ml}$, Sigma P-7405) durante 24h a 37°C, lavados posteriormente 3 veces con H₂O estéril y secados en campana. Para ello, se retira el medio de cultivo de la placa de mantenimiento, se lava una vez con PBS (NaCl, 120mM, Na₂HPO₄ 8.8mM, KH₂PO₄ 3.2mM) y se añade tripsina-EDTA 0.25%. Una vez levantadas todas las células del cultivo, se inactiva la tripsina añadiendo 10 ml de medio de cultivo. Se mezcla con cuidado y se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retira el sobrenadante y el precipitado celular se resuspende en 1 ml de medio de cultivo. Por último, se siembran las células en los cubreobjetos previamente tratados, a una densidad de 5×10^3 células por pocillo, en gota de 50 μl de medio de cultivo, durante 2 horas a 37°C, con 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95%. Una vez adheridas, el volumen de medio de cultivo se lleva a 300 μl y se añade FGF-2 recombinante (20 ng/ml).

El cultivo fue mantenido a 37°C, 5% de CO₂ y una humedad relativa del 95% durante 24 ó 72 horas en la condición experimental requerida (música, ruido y silencio). Este procedimiento se repitió en cinco ocasiones. Los cultivos que posteriormente se emplearían para determinar el grado de replicación celular fueron tratados con 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma Ref: B 9285). Para ello, 2 horas antes de fijar el cultivo, se añadió BrdU (0'3 nM).

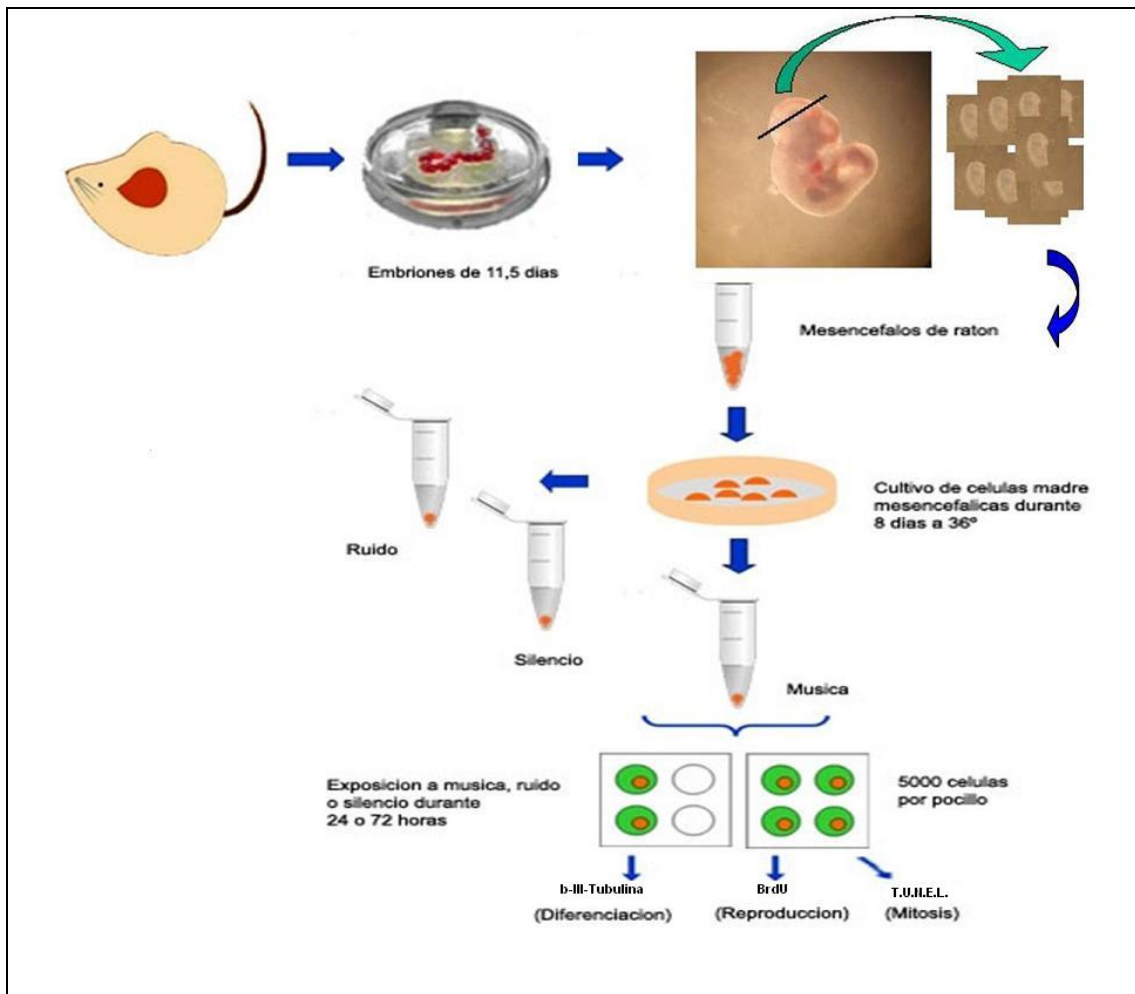


Fig.12. Esquema del diseño experimental

Todas las operaciones fueron realizadas en campanas de flujo laminar y con máximas condiciones de esterilidad.

2. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Las células, cultivadas como hemos descrito previamente, fueron inicialmente expuestas a tres condiciones experimentales. Una de control (silencio) y dos de intervención (música y ruido).

Para la calibración del montaje acústico experimental que llevamos a cabo utilizamos el hardware Symphonie de la marca "01dB" (ver Fig.13). El hardware Symphonie permite conectarlo a varios transductores (dispositivos que captan una señal y la transforman en una señal eléctrica) en nuestro caso se ha usado un micrófono. El transductor está conectado al Symphonie a través de un canal de adquisición de datos, datos que se transfieren en tiempo real a un ordenador portátil, a través de un PCCARD (PCMCIA).



Fig.13. Equipo empleado para el registro de las mediciones acústicas

El hardware Symphonie combina varias funciones, grabación de la señal de audio, medición del nivel de ruido y visualización de un espectro de frecuencia en tiempo real.

El micrófono que empleamos es el 2639 de Brüel&Kjaer (B&K) con un rango de 2Hz-200kHz \pm 0,5dB de precisión. El micrófono se calibró con un calibrador de nivel sonoro 4230 de B&K, de precisión \pm 0,3dB (da un tono de 94dB a 1kHz).

Para las medidas de presión sonora utilizamos además el analizador modular de precisión tipo 2260 de Brüel&Kjaer (Investigator), que permite medir, analizar y registrar todos los parámetros acústicos por octavas.

Para las medidas de vibración usamos el acelerómetro piezoeléctrico tipo 4382 de B&K (se trata de un transductor cuya salida es proporcional a la aceleración de entrada). Este transductor se conectó al analizador B&K 7651 de un canal.

Para el tratamiento de los datos además del software propio del Symphonie (dBENV32 y dBTRAIT32) utilizamos el programa gratuito “Audacity 1.3.3-beta” (unicode) y el programa en versión “Demo Wavelab5” (Steinberg Media Technologies).

Las medidas de nivel de presión sonora equivalente (L_{eq}) y nivel máximo (L_{max}) se han realizado con un analizador (B&K) para las tres condiciones silencio, ruido y música.

Para todas las mediciones realizadas, en relación con las tres condiciones experimentales, contamos con la colaboración del Dr. Carlos de Castro Carranza del Departamento de Física Aplicada de la ETSI Informática de la UVA.

Nivel de Presión Sonora (L o SPL)

El nivel de presión sonora está relacionado con la intensidad sonora (se define para que coincidan), la que a su vez es proporcional al cuadrado de la onda sonora. Dicho nivel se expresa en decibelios (dB) y se define por la siguiente relación matemática: $L = 20 \text{ Log } (P/P_0)$

Donde P es el valor eficaz de la presión sonora medida.

P₀ es el valor eficaz de la presión sonora de referencia, $2 \times 10^{-5} \text{ [N/m}^2\text{]}$

Nivel de Presión Sonora Continuo Equivalente (L_{eq}):

Es aquel nivel de presión sonora constante, expresado en decibelios, que en el mismo intervalo de tiempo contiene la misma energía total que el ruido o señal medidos. En nuestro caso el tiempo de medida fue de un minuto o dos.

Nivel de Presión Sonora Máximo (L_{max})

Es el nivel de presión sonora equivalente (medido en 1/8 de segundo) máximo registrado durante un período de medición dado. En nuestro caso un minuto. Es decir, durante un minuto el analizador registra los L_{eq} cada 1/8 de segundo y luego proporciona el máximo de ellos.

Realizamos las medidas de nivel de presión sonora equivalente (L_{eq}) y nivel máximo (L_{max}) durante un minuto para las tres condiciones silencio, ruido y música. Registramos estos niveles tanto en octavas de frecuencia como en el espectro total de frecuencias. Para ello, introdujimos uno de los dos altavoces del aparato reproductor de sonido dentro del incubador y siempre en la misma posición. Con él se introdujo un analizador o un micrófono.

2.1) Ruido del Incubador: Silencio

Primeramente, medimos la presión sonora equivalente para el ruido del incubador (ver Tabla 1), al que iban a estar sometidas las células inevitablemente y de manera constante en cada una de las tres condiciones experimentales. A esta situación sonora la denominamos “silencio” y la tomamos como condición control. Observamos que el ruido del incubador era aproximadamente estable salvo en cortos periodos de tiempo en los que la entrada de CO₂ en el mismo generaba un aumento de nivel de presión sonora. Registramos un nivel L_{max} 71,4 y un L_{eq} de 56,9dB, y decidimos que el nivel de presión sonora L_{eq} tanto para ruido como para música supere los 95dB; de esta forma la energía acústica en las condiciones de ruido y música será unas 10000 veces mayor que la energía en la condición que hemos llamado silencio.

| | RUIDO INCUBADOR (SILENCIO) |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Frecuencias (Hz) | 125 |
| L_{eq} (dB) | 56,9 |

Tabla 1. Medición del L_{eq} del ruido del incubador a 125Hz

2.2) Música

Como música, elegimos una pieza de música sinfónica por su variedad tímbrica y su amplio espectro de frecuencias al contar con muchos tipos de instrumentos, cada uno de ellos con su timbre o sonido característico propio, que abarcan en conjunto un amplio registro sonoro. Dentro de la gama de piezas con estas características, seleccionamos el *Allegro* del “Concierto para flauta, arpa y orquesta en Do M, K299” de Wolfgang Amadeus Mozart (no queremos dar relevancia al autor en concreto, sino al hecho de usar una pieza de música sinfónica). La duración de la pieza es de 11 minutos y 30 segundos y se repite sucesivamente a lo largo de todo el cultivo.

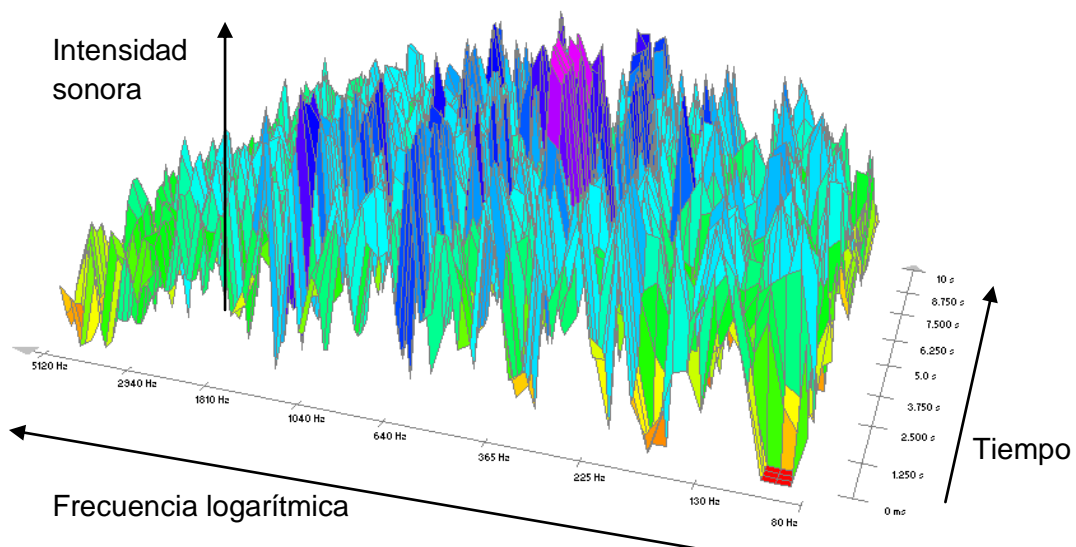
Determinamos, usando el Symphonie (para la primera vez) o el analizador 2260 (B&K) (para el resto de las ocasiones), la presión sonora equivalente de la pieza por octavas de frecuencia (ver Tabla 2). Registramos, para cada octava de frecuencia, los dos primeros minutos de la pieza ya que los consideramos suficientemente representativos de la pieza total (el nivel de presión sonora de la pieza total es de unos 2dB más bajo que el de los dos primeros minutos). A continuación calibramos la salida del altavoz y por ensayo y error ajustamos la ganancia del aparato de música (botón de volumen) para que en las octavas centrales la medida del analizador se encuentre entre 90 y 92 dB.

A frecuencias bajas el altavoz, dado su pequeño tamaño, genera un nivel de sonido más bajo que el de la música grabada en el CD, en cambio a frecuencias más altas es más fiable.

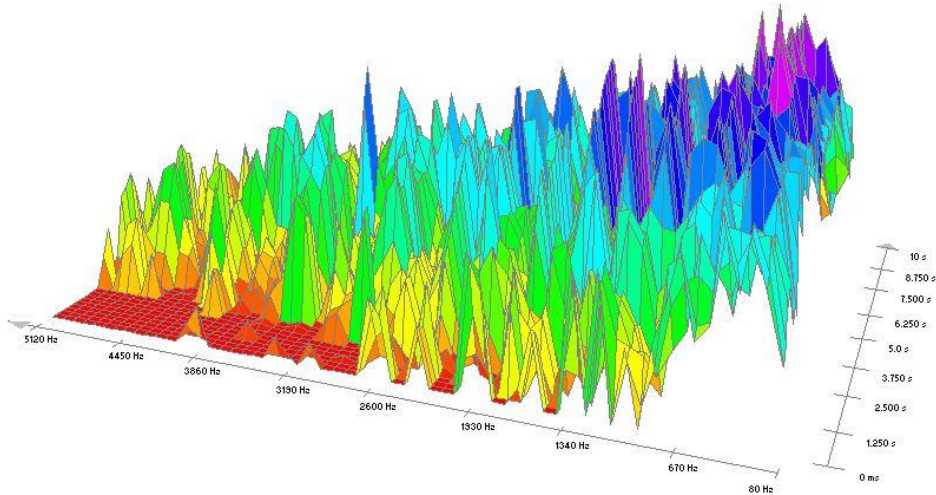
| M Ú S I C A | | | | | | |
|-----------------------------------|------|------|-------|-------|-------|------|
| Octavas de frecuencia (Hz) | 125 | 250 | 500 | 1000 | 2000 | 4000 |
| L_{eq} (dB) | 64,0 | 92,0 | 91,1 | 91,6 | 88,9 | 75,4 |
| L_{max} | 76,9 | 108 | 106,7 | 105,6 | 101,5 | 86,9 |

Tabla 2. L_{eq} L_{max} de la pieza de música orquestal medida por octavas de frecuencia

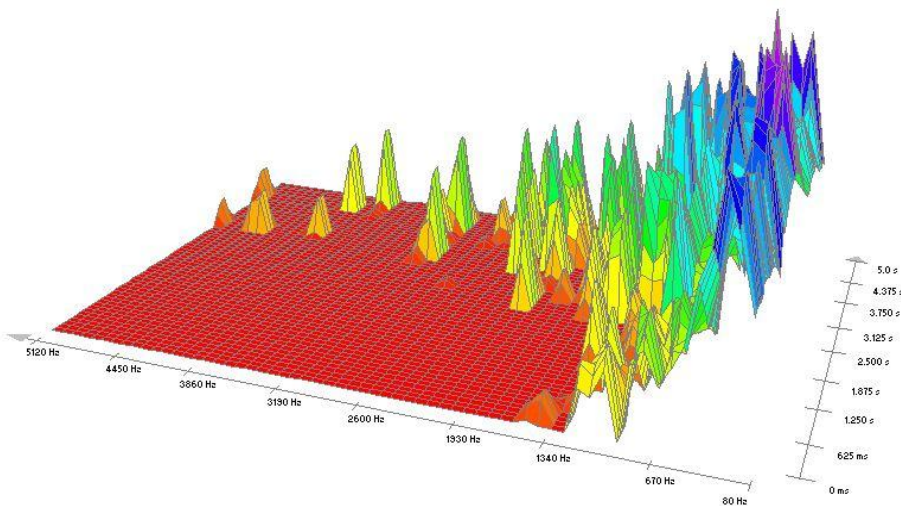
La energía acústica promedio y total que reciben las células en las octavas centrales (250-2000Hz) tanto durante la aplicación de música como de ruido es aproximadamente la misma y resulta mucho mayor que la situación de silencio. En la música hay momentos (e.g. el arpa sola) en los que la energía disminuye mucho. Esto implica que hay momentos (e.g. orquesta) en los que la energía es mayor que en el ruido, donde la energía acústica emitida en cada momento es siempre constante (ver Gráficos 1, 2 y 4).



(Gráfico 1-A.) Espectro entre t= 30 y t =40 segundos, orquesta (dB)



(Gráfico 1-B.) Espectro entre t = 2:25 s y 2:35 s, arpa y flauta (dB)



(Gráfico 1-C.) Espectro entre 9:01 y 9:06 arpa sola (dB)

Gráfico 1. Distintos momentos del espectro de frecuencias, en función del tiempo y la intensidad sonora, para la música: el color indica la amplitud en dB de la intensidad sonora en cada instante y frecuencia

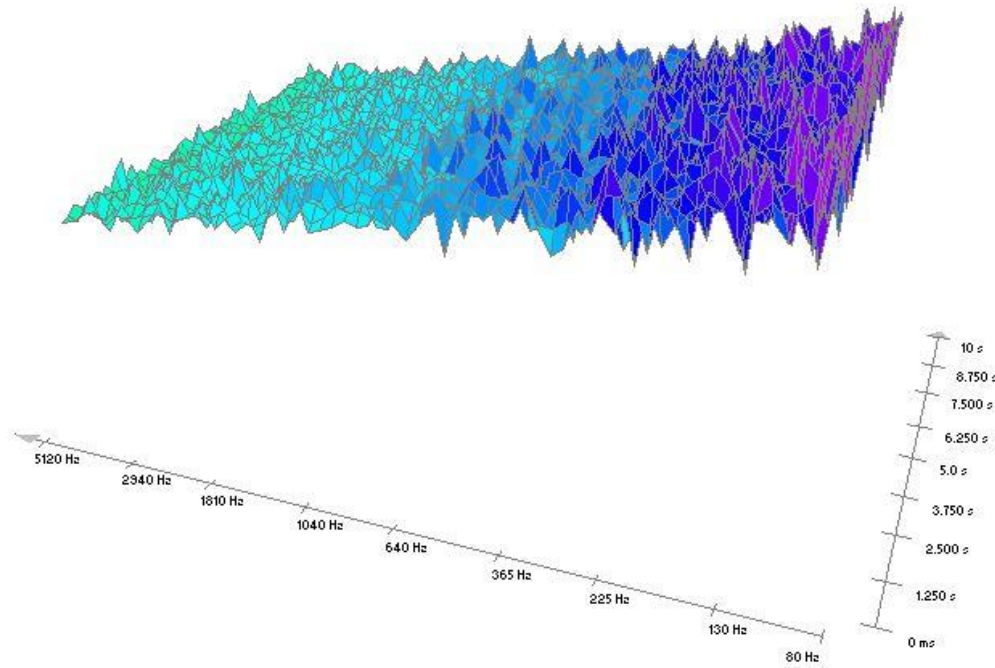


Gráfico 2. Espectro de frecuencia del ruido rosa empleado de 10 segundos de duración: el color indica la amplitud en dB de la intensidad sonora en cada instante y frecuencia

2.3) Ruido

Como ruido hemos decidido usar el denominado “ruido rosa” que se caracteriza por generar siempre la misma presión sonora en cada octava de frecuencia, lo que significa que la energía acústica desciende con una pendiente de 3dB en función de la frecuencia (ver Gráfico 3). Es decir, la energía acústica que se emite entre 220Hz y 440Hz es la misma que entre 440Hz y 880Hz y la misma que entre 880Hz y 1760Hz, etc. Cada banda de frecuencias de igual anchura (octava) contiene así la misma energía total.

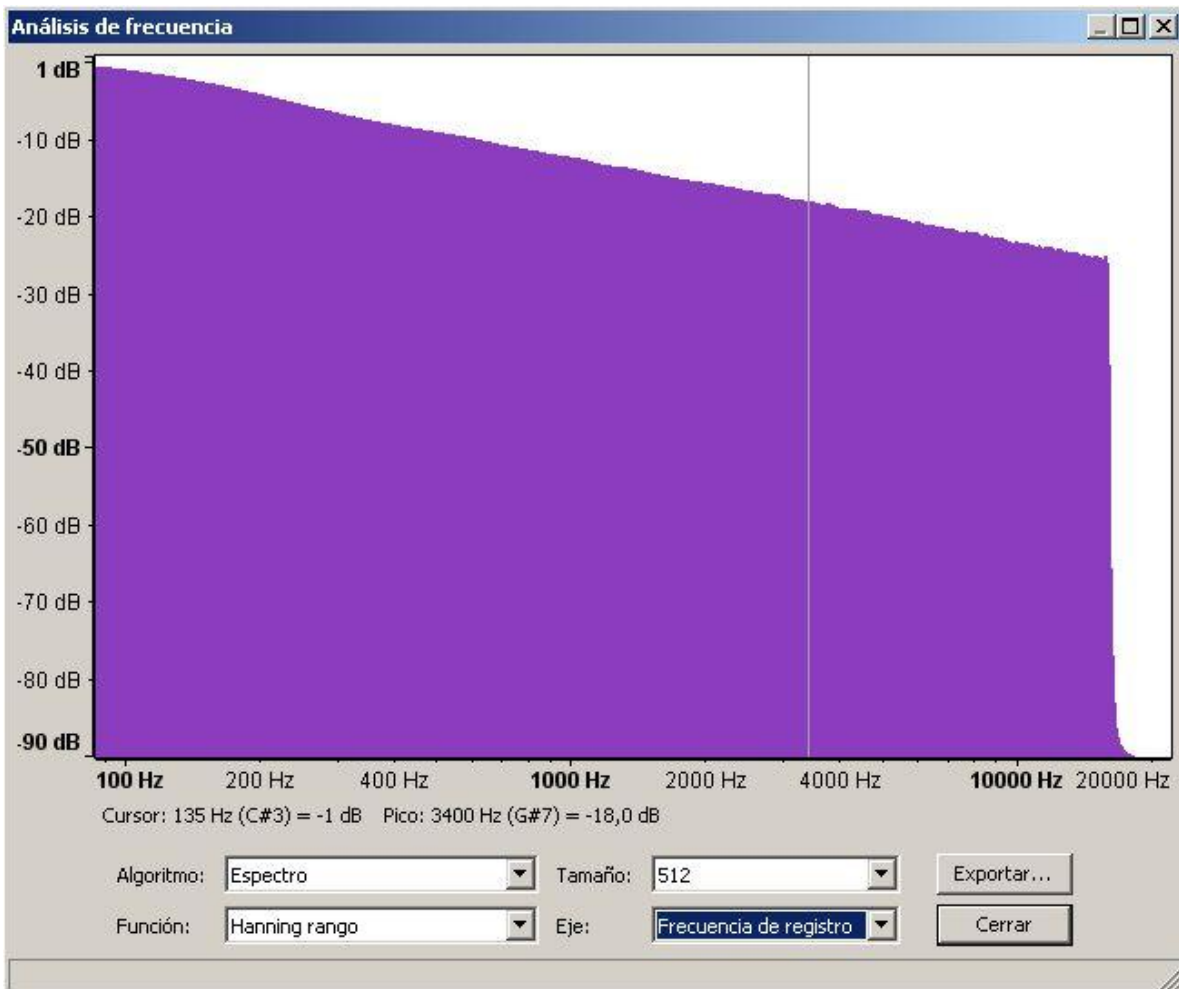
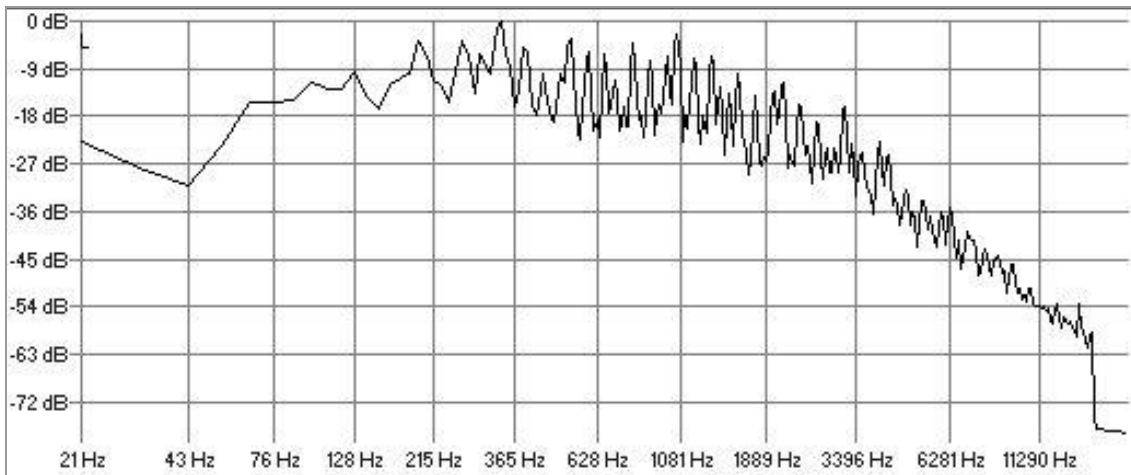


Gráfico 3. Intensidad sonora del ruido rosa empleado en función de la frecuencia de registro

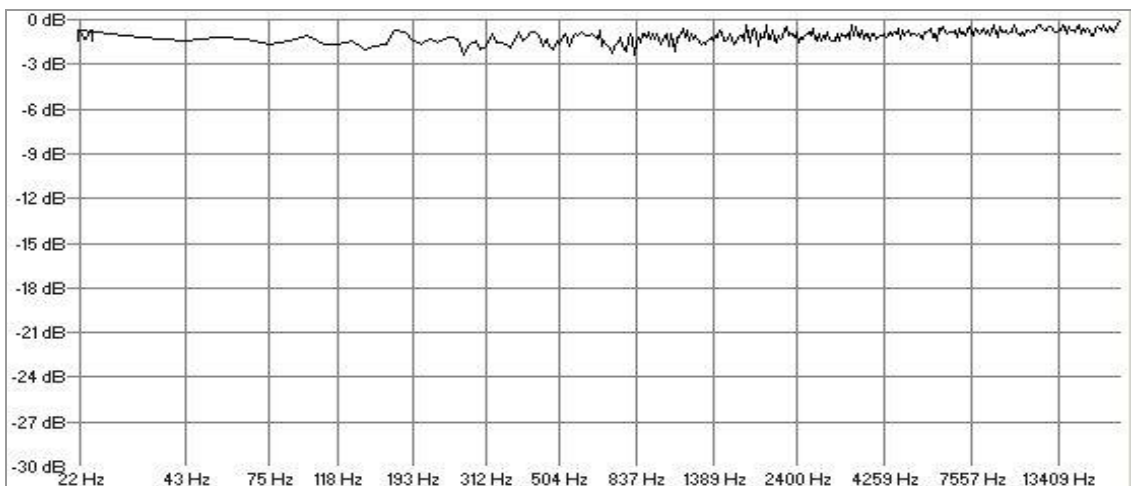
Se eligió ruido rosa en lugar del blanco porque la distribución de energía del ruido rosa es más parecida a la que tiene la música sinfónica, tipo de música empleado en esta investigación. El ruido blanco se caracteriza por emitir la misma intensidad sonora en cada frecuencia (ver Gráfico 4).



(Gráfico 4-A.) Espectro de frecuencias de la música empleada. Se representa la intensidad sonora relativa (equivalente al nivel de presión sonora) en decibelios en función de la frecuencia en escala logarítmica. Se observan grandes fluctuaciones y una caída de 60dB entre las frecuencias de 300 y 15000 Hz



(Gráfico 4-B.) Espectro de frecuencias del ruido rosa empleada. Se observa que en el intervalo de frecuencias audible humano (20Hz-20KHz) cae 30 dB



(Gráfico 4-C) Espectro de frecuencias del ruido blanco. Se observa una intensidad sonora aproximadamente constante en función de la frecuencia

Gráfico 4. Espectros de frecuencias de la música y el ruido rosa empleados y del ruido blanco

La ganancia del volumen del aparato reproductor de música se mide a través del nivel de la presión sonora equivalente del ruido rosa en la octava de frecuencia correspondiente al mayor L_{eq} de la pieza musical (250 Hz), llevando el volumen del reproductor hasta lograr un nivel cercano a los 92,0 dB para dicha octava (ver Tabla 3).

| | RUIDO ROSA |
|------------------|-------------------|
| Frecuencias (Hz) | 250 |
| L_{eq} (dB) | 92,5 |

Tabla 3. Medición del L_{eq} del ruido rosa a 250Hz

Desde el punto de vista temporal, tanto el ruido blanco como el ruido rosa se caracterizan por un nivel de presión sonora aproximadamente continuo o constante, el L_{eq} y el L_{max} de cualquier intervalo en estos casos serán parecidos (ver Gráfico 5, donde se observan variaciones inferiores a los 2dB-). Sin embargo, aunque la música que se ha empleado lleva en promedio la misma energía o nivel de presión sonora que el ruido rosa, la música fluctúa mucho más mientras que el ruido lo hace sólo a escalas de tiempo muy pequeñas y de forma aleatoria (ver Gráficos 5 y 6).

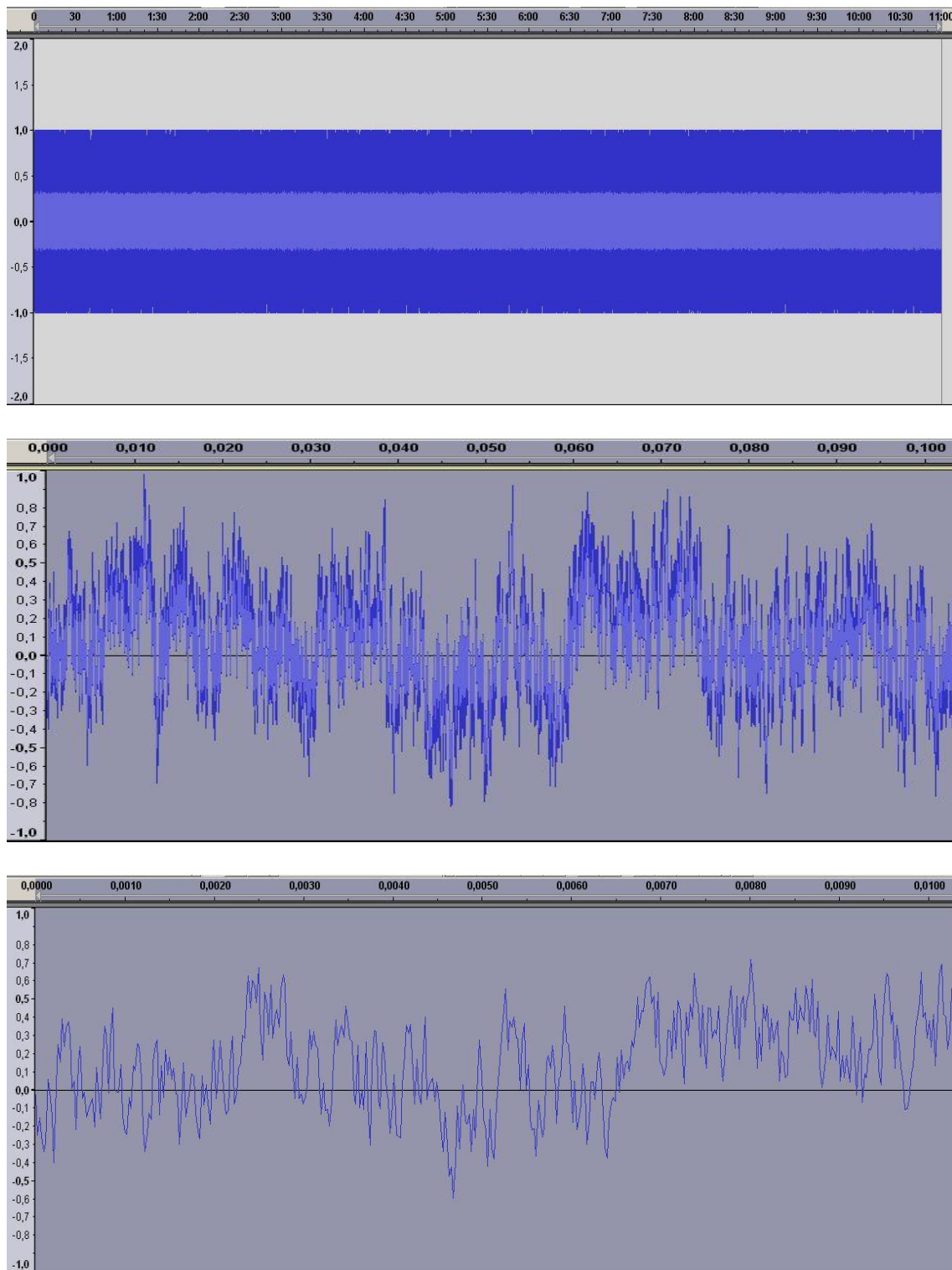


Gráfico 5. Presión sonora del ruido rosa en función del tiempo: intervalos de 11 minutos, 1 décima de segundo y 1 centésima de segundo de arriba abajo respectivamente

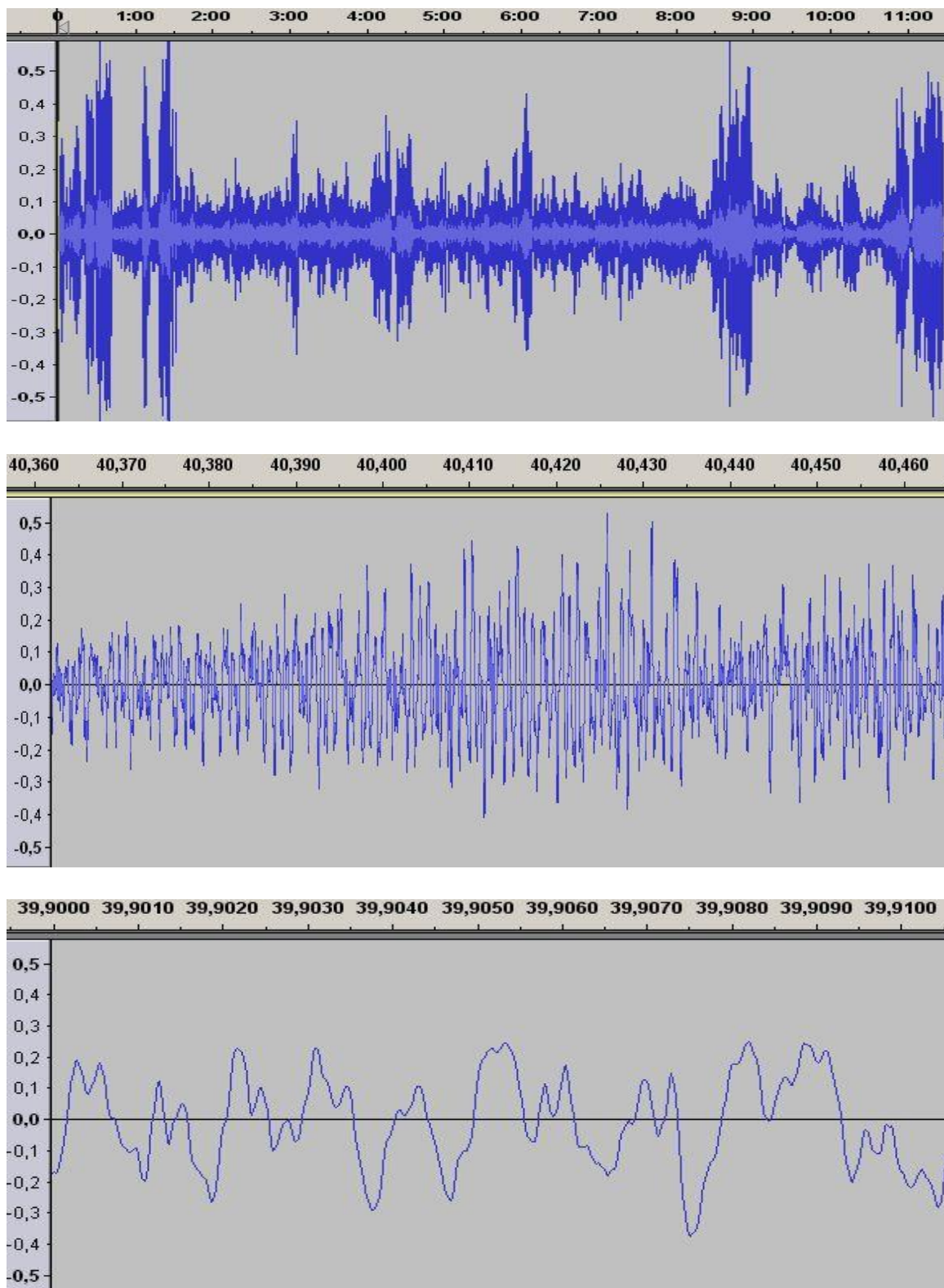


Gráfico 6. Presión sonora de la música empleada en función del tiempo: de arriba abajo pieza completa, una décima de segundo y una centésima de segundo respectivamente

Como ya hemos comentado, la reproducción sonora, tanto en la condición de “ruido” como en la de “música”, fue continua durante las 24h ó 72h que las células se mantuvieron en el interior del incubador de CO₂.

Para dar una idea del nivel de presión sonora equivalente a la que se sometió a las células en las condiciones de ruido y música se incluye la siguiente tabla.

| Nivel de Presión acústica L _{eq} (dB) | Ambientes-Actividades Aparatos-Situaciones |
|---|--|
| 130 | Motor a reacción (a 10 m). Sirena de Trasatlántico. Tracas de artificio. |
| 120 | Martillo pilón (a 1 m). |
| 110 | Motocicleta a escape libre (a 1 m). Martillo neumático. |
| 100 | Discoteca. Sierra circular. Sirena de coche (a 10 m). |
| 90 | Taller mecánico. Imprenta. Sonajero (a 30 cm). Túnel de limpieza de coches. |
| 80 | Interior del metro. Calle ruidosa. Bar animado. Niños jugando. Cadena de montaje. |
| 70 | Conversación en voz alta. Oficinas. Almacenes. Extractor de humos (a 1 m). Tráfico rodado. |
| 60 | Conversación sosegada. Restaurante. Comercio. Ventilador (a 1 m). Lluvia. I |
| 50 | Aula (ruido de fondo). Calle tranquila. Ronquido. Oficina (ruido de fondo). |
| 40 | Sala de estar (ruido de fondo). Roce de la ropa. Biblioteca. |
| 30 | Dormitorio. Frigorífico (a 1 m). |
| 20 | Estudio de radio. Iglesia antigua vacía. Vuelo de un mosquito (a 2 m). |
| 10 | Cabina audiométrica. Laboratorio de acústica. Ruido de la respiración. |
| 0 | Umbral de audición de un joven sano promedio. |
| - 10 | Se oye la vida del propio cuerpo. |

Tabla 4. Niveles aproximados de presión acústica para diversos ambientes

| Experimento | Condiciones experimentales | Tiempo de exposición | Atenuación de la vibración | Variables resultado |
|-------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|
| I | Silencio, Ruido, Música | 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| II | Silencio, Ruido, Música | 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| III | Silencio, Ruido, Música | 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| V* | Silencio, Ruido, Música | 24h | SI/NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| VI | Silencio, Ruido, Música | 24h | SI/NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| VII | Silencio, Ruido, Música | 24h | SI/NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| VIII | Silencio, Ruido, Música | 24h y 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| IX | Silencio, Ruido, Música | 24h y 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| X | Silencio, Pulso, Pulso Nota | 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |
| XI | Silencio, Pulso, Pulso Nota | 72h | NO | IMCP, Neurogénesis, Replicación |

Tabla 5. Resumen del proceso experimental (IMCP: índice de muerte celular programada)

* Por incidencias en el proceso se prescinde del experimento IV

3. OTRAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Tras llevar a cabo tres experimentos con las condiciones expuestas anteriormente, nos planteamos otras alternativas en el diseño experimental (ver Tabla 5) que nos permitan aclarar a qué variable pueden ser atribuidos los efectos encontrados. En este sentido nos proponemos valorar la influencia de la variable “tiempo de exposición”, el “exceso de vibración” y elementos de la música que la distinguen del ruido.

3.1) Reducción del tiempo de exposición al estímulo sonoro

En primer lugar y para valorar si los resultados son similares en función del tiempo de exposición al estímulo sonoro, mantuvimos el mismo diseño experimental con exposición a las tres condiciones experimentales durante 24 horas en lugar de 72 horas en cada caso.

3.2) Valoración del exceso de vibración

Para valorar la energía vibratoria que llega a la placa de Petri y su posible influencia en los resultados del estudio, buscamos un sistema amortiguador de esa energía vibratoria (material aislante).

Para las medidas de vibraciones, utilizamos un acelerómetro (B&K) y un analizador para registrar en dB las aceleraciones a las que estaban sometidas las células. Tratamos de amortiguar las vibraciones mediante una plancha de fibra de vidrio y otra de goma. Además, para desacoplar el altavoz de la plancha metálica donde se apoyan habitualmente altavoz y placas, el altavoz se colgó de una percha (ver Gráfico 7).

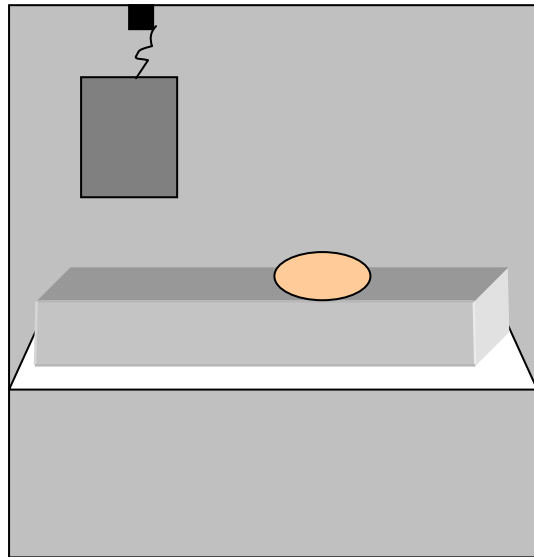


Gráfico 7. Esquema del interior de la cámara de cultivo en condiciones de amortiguación de la vibración

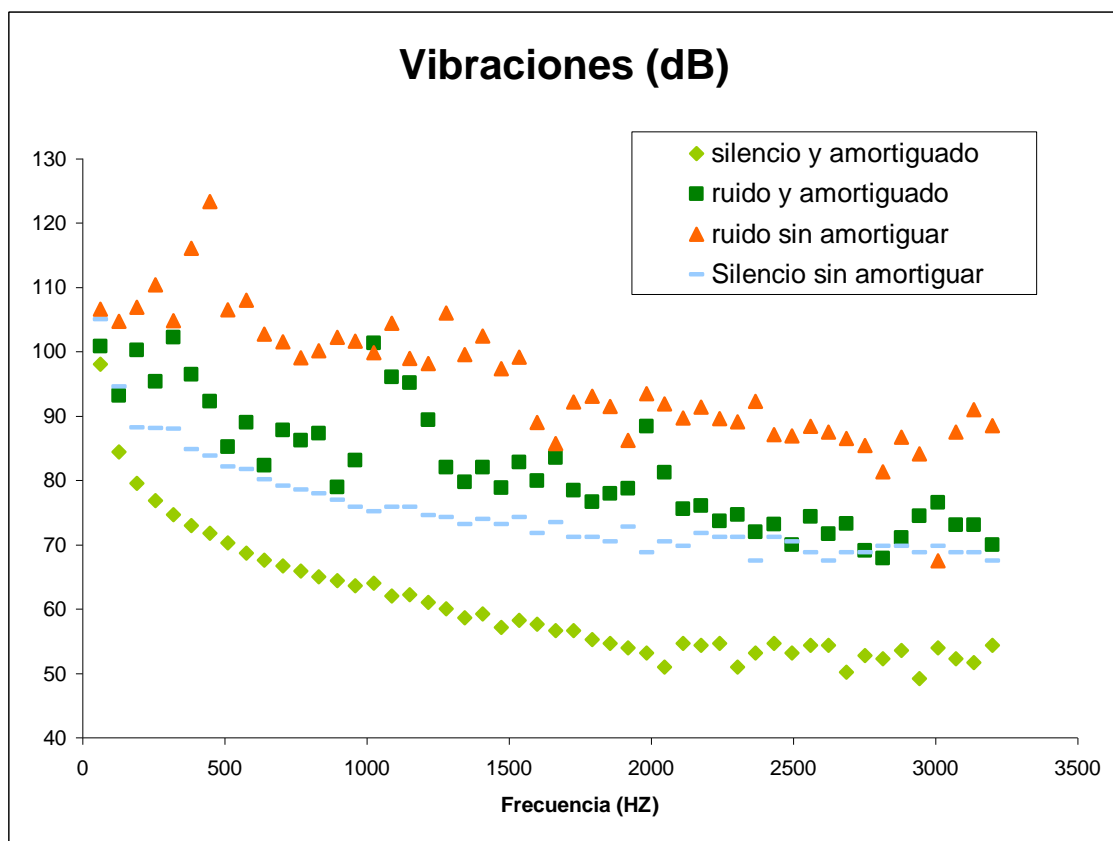


Gráfico 8. Registro de las aceleraciones recibidas por las células en las condiciones de Silencio y Ruido: no registramos las aceleraciones para la música debido a su espectro no uniforme, que induce a errores ya que no sabríamos si las variaciones se dan debido a su particularidad especial (notas aquí y allá) o a la amortiguación de los aparatos

Recogemos el registro de las aceleraciones recibidas por las células a determinadas frecuencias para valorar el efecto de nuestro sistema amortiguador. Como se aprecia en el Grafico 8, en las condiciones de silencio registramos caídas de la energía vibratoria entre 10 y 15dB en sistema amortiguado respecto del sin amortiguar. En el caso de las condiciones de ruido, las diferencias son más variables siendo el efecto general el mismo: caídas mayores de 10 dB en el ruido amortiguado comparado con el ruido sin amortiguar. No obstante, si observamos con detalle la gráfica de ruido amortiguado vemos que para determinadas frecuencias no hemos conseguido una amortiguación apreciable (ver Grafico 8, frecuencias alrededor de 1000, 2000 y 3000Hz). Por otro lado, es interesante comparar la gráfica de ruido amortiguada (cuadrados verdes) y la del silencio sin amortiguar (guiones azules), especialmente a altas frecuencias, donde las diferencias son muy pequeñas. Estos datos nos indican que el efecto de nuestro sistema de amortiguación es suficientemente grande ya que si las vibraciones y no el sonido fuera lo único que llega a las células de forma significativa, entonces la respuesta de las células al silencio sin amortiguar sería similar a la del ruido amortiguado.

3.3) Valoración de elementos propios de la música

Para valorar el efecto de elementos de la música no presentes en el ruido decidimos emplear el pulso por ser el elemento más básico de la música. Para generar el pulso utilizamos un metrónomo a 60 golpes por minuto. Grabamos su sonido en un CD (sin pasar por un altavoz) y lo reproducimos. El pulso con el metrónomo es un pulso que lleva muchos componentes de frecuencia, mientras que el pulso nota porta la frecuencia fundamental (440Hz) escogida y sus armónicos (ver Gráficos 9 y 10).

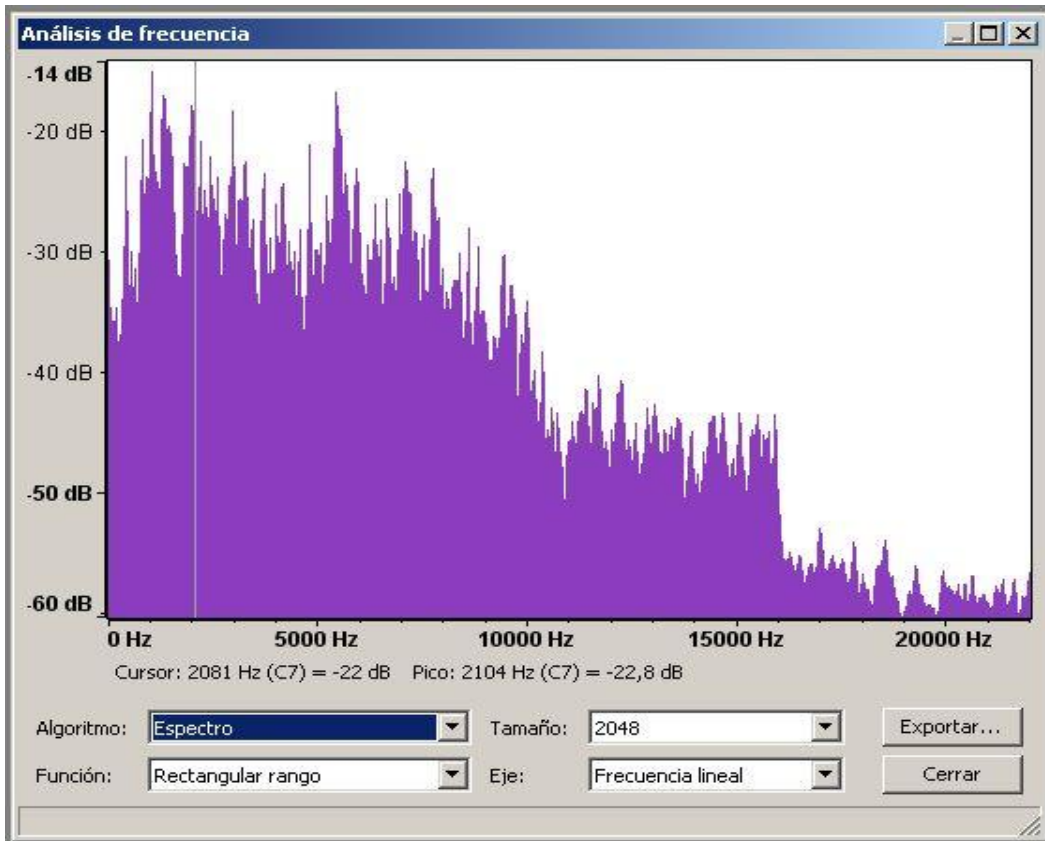


Gráfico 9. Análisis de frecuencia del pulso (metrónomo)

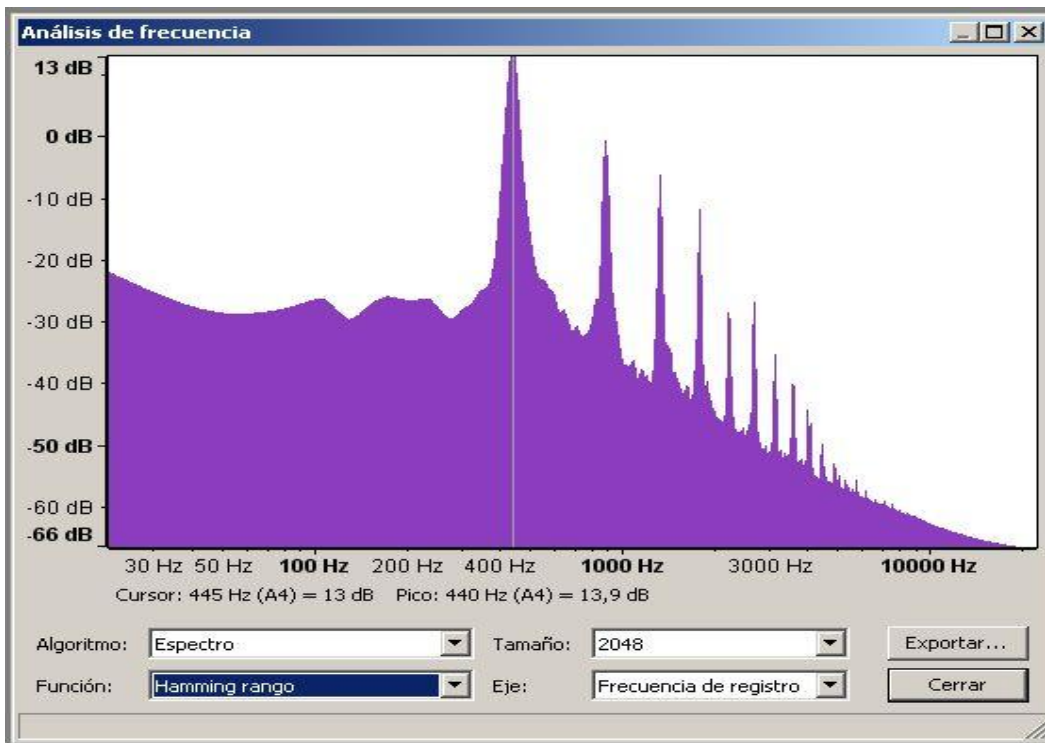


Gráfico 10. Análisis de frecuencia del "pulsos nota"

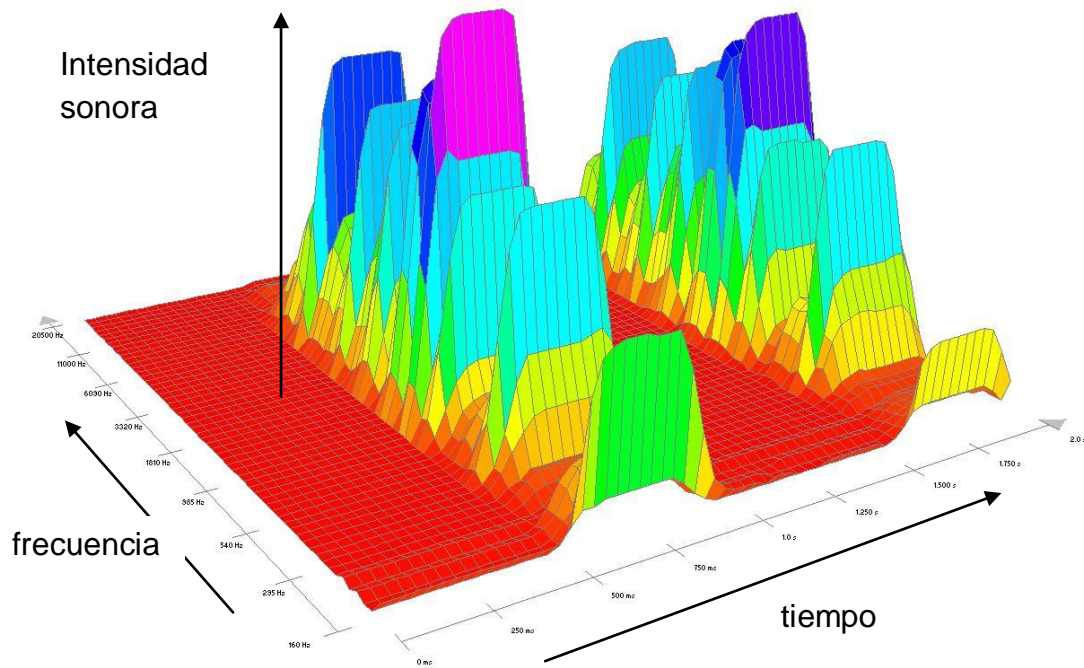


Gráfico 11. Espectro temporal y de frecuencia del pulso (metrónomo): se observan dos pulsos

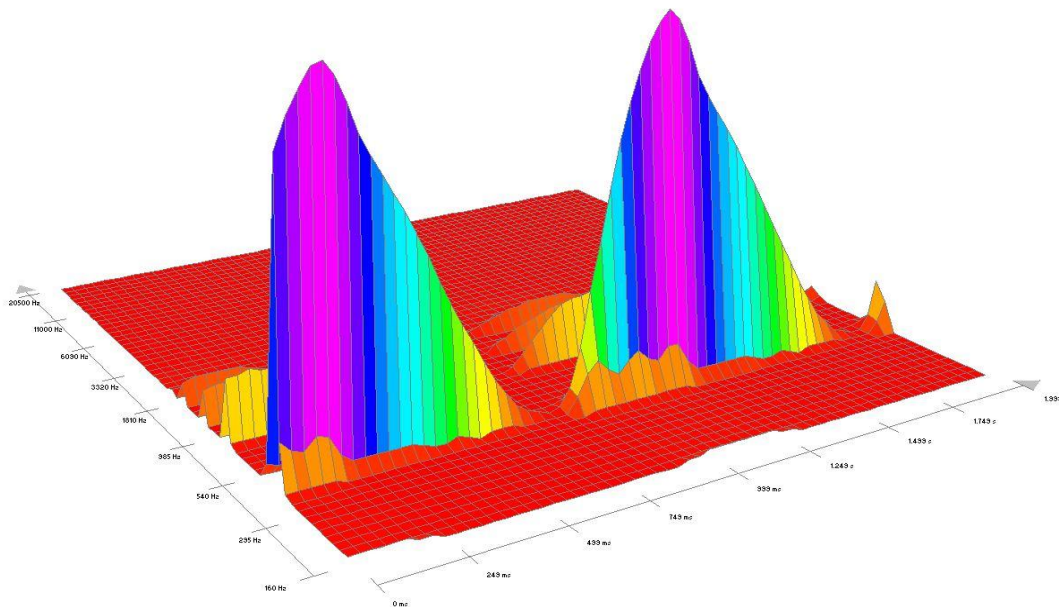


Gráfico 12. Espectro temporal y de frecuencia del “pulsos nota”: se observan dos pulsos

El pulso nota se hizo a partir de la nota “la” 440 Hz de un teclado electrónico reproducida a la misma velocidad que el pulso.

Para ambos casos se ajustó el volumen del altavoz hasta que las medidas del analizador arrojaban valores para el L_{eq} ligeramente superiores a los 90dB y similares a los registrados para el ruido rosa (+-1dB).

4. TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

4.1) Estudio de la supervivencia celular: T.U.N.E.L.

Para valorar la influencia del cultivo, así como de las diferentes condiciones experimentales, sobre el índice de muerte celular programada en las células neuroepiteliales, se emplea la detección de células apoptóticas mediante la técnica de T.U.N.E.L, realizada con un kit comercial (Promega) siguiendo las especificaciones dadas por el proveedor:

- CINA 0.85%
- PBS.- 2 x 5'
- Formol al 4% en PBS.-15' a temperatura ambiente.
- PBS.- 2 x 5'
- Buffer de equilibrio.- 10'
- Mezcla del nucleótido.- 4h. A temperatura ambiente
- SSC.-15'
- PBS.- 2 x 5'
- Agua destilada.- 5'
- Montaje con medio acuoso fluoromunt (SIGMA Ref:F4680).

4.2) Estudio de la proliferación: BrdU

Una vez finalizado el cultivo retiramos el medio de cultivo, lavamos una vez con PBS y lo fijamos con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 30 minutos. A continuación lavamos los cultivos dos veces con PBS y los mantenemos en PBS a 4°C.

Para el estudio de la proliferación celular empleamos la técnica de incorporación de BrdU. Iniciamos el protocolo con la desnaturalización del DNA, para ello, añadimos HCl 2N durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, retiramos el HCl y realizamos tres lavados de 5 minutos con PBS.

A partir de este paso, las inmunocitoquímicas realizadas para la detección de la diferenciación y de la proliferación celular son similares.

El anticuerpo primario utilizado en este estudio fue el anti- BrdU (Dako). Realizamos el bloqueo de la peroxidasa endógena añadiendo H₂O₂ al 0'3% en dH₂O durante 30' a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS, bloqueamos la unión inespecífica del anticuerpo primario con 1% de suero bovino fetal. Tanto la solución de bloqueo como la solución de lavado contenían PBS al 0.1% de Tritón X-100 y 1% de suero bovino fetal.

Tras 10 minutos de bloqueo incubamos, durante 16-18 horas a 4°C, el anticuerpo primario con la siguiente dilución: anti- BrdU (1/100). Transcurrido el tiempo de incubación se realizan tres lavados con PBS + 1% de Tritón X-100 + 1% de suero bovino fetal durante 10 minutos cada vez.

El anticuerpo secundario utilizado fue un goat anti-mouse biotinilado a una dilución 1/20 (ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit mouse. SIGMA). Tras 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, realizamos 3 lavados con PBS y lo incubamos de nuevo durante 15 minutos a temperatura ambiente con ExtrAvidin Peroxidase (ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit mouse. SIGMA) a una dilución 1/20.

Transcurrido el tiempo de incubación indicado por el fabricante, llevamos a cabo sucesivos lavados con PBS y posteriormente incubamos con Diaminobencidina [DAB (SIGMA Ref: D5905)] siguiendo las instrucciones dadas por el proveedor. A continuación realizamos 3 lavados con PBS para eliminar la DAB y un lavado con dH₂O y procedimos al montaje de los cubreobjetos utilizando el medio de montaje (tipo SIGMA). Finalmente lo guardamos a 4°C hasta su uso.

4.3) Estudio de la diferenciación celular: β -III-Tubulina

Al igual que en el estudio de la proliferación celular, en el caso del estudio de la diferenciación celular una vez finalizado el cultivo retiramos el medio de cultivo, lavamos una vez con PBS y lo fijamos con paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 30 minutos. A continuación lavamos los cultivos dos veces con PBS y los mantenemos en PBS a 4°C.

En este caso no es necesario desnaturalizar el DNA y pasamos directamente a bloquear la peroxidasa endógena añadiendo H₂O₂ al 0'3% en dH₂O durante 30' a temperatura ambiente. El anticuerpo primario utilizado en este estudio fue el anti β -III-Tubulina (Covance). Tras tres lavados con PBS, bloqueamos la unión inespecífica del anticuerpo primario con 1% de suero bovino fetal. Tanto la solución de bloqueo como la solución de lavado contenían 0.1% de Tritón X-100 y 1% de suero bovino fetal en PBS.

Tras 10 minutos de bloqueo incubamos, durante 16-18 horas a 4°C, el anticuerpo primario con la siguiente dilución: anti β -III-Tubulina (1/500). Transcurrido el tiempo de incubación se realizan tres lavados con PBS + 1% de Tritón X-100 + 1% de suero bovino fetal durante 10 minutos cada vez.

El anticuerpo secundario utilizado fue un goat anti-mouse biotinilado a una dilución 1/20 (ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit Mouse, SIGMA). Tras 45 minutos de incubación a temperatura ambiente, realizamos 3 lavados con PBS,

incubándose de nuevo durante 15 minutos a temperatura ambiente con ExtrAvidin peroxidase (ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit mouse. SIGMA) a una dilución 1/20. Transcurrido el tiempo de incubación indicado por el fabricante, llevamos a cabo sucesivos lavados con PBS y posteriormente incubamos con Diaminobencidina [DAB (SIGMA Ref: D5905)] siguiendo las instrucciones dadas por el proveedor. A continuación realizamos 3 lavados con PBS para eliminar la DAB y un lavado con dH₂O y procedimos al montaje de los cubreobjetos utilizando el medio de montaje (tipo, SIGMA). Finalmente lo guardamos a 4°C hasta su uso.

5. ANÁLISIS DE LOS CULTIVOS CELULARES

Debido a la variabilidad en el número de células en cultivo y para homogeneizar los resultados, usamos como parámetro comparable el número de células positivas para cada inmunohistoquímica con respecto del total de células por campo microscópico, siendo esta relación expresada en porcentaje.

5.1) Estudio del índice de muerte celular programada (IMCP): conteo de muerte celular

Para determinar el daño sufrido por las células tanto por las técnicas de cultivo en inmunohistoquímicas como debido a cada condición experimental, hemos valorado la apoptosis mediante la técnica de T.U.N.E.L. visualizada mediante un microscopio confocal (Zeiss LSM-310).

Para valorar el índice de muerte celular programada (IMCP) en cada condición experimental, contamos con 12 muestras distintas de al menos 3 experimentos diferentes.

En cada caso hicimos un recuento del número de células neuroepiteliales marcadas (ver Fig.14) analizando 20 campos microscópicos elegidos al azar por cada muestra.

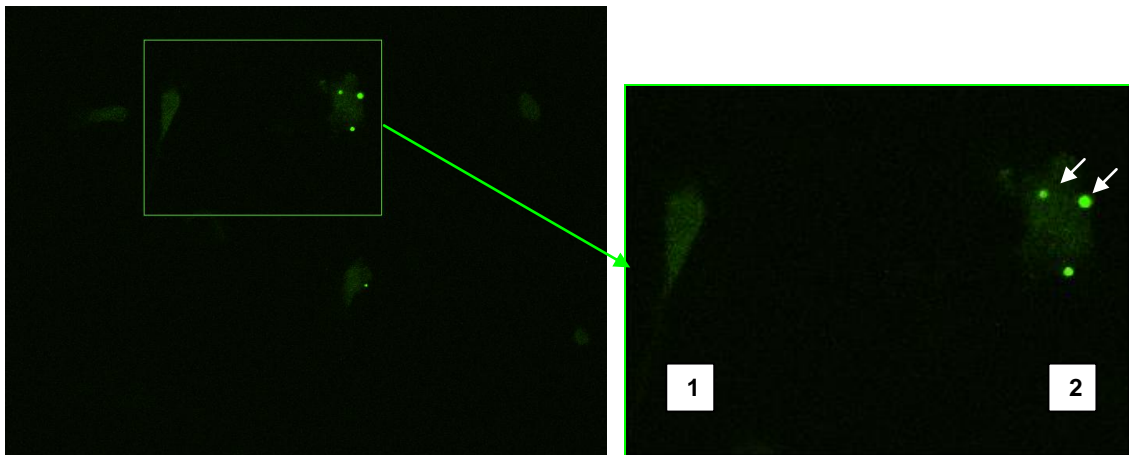


Fig. 14. Células T.U.N.E.L. positiva (2) y T.U.N.E.L. negativa (1)

5.2) Estudio de la proliferación celular: Conteo de mitosis

Para valorar la proliferación celular en cada condición experimental, contamos con 12 muestras distintas de al menos 3 experimentos diferentes por cada diseño experimental. Con el fin de determinar la variación en el patrón de síntesis de DNA realizamos un recuento del número de células neuroepiteliales cuyo núcleo resultó marcado con anticuerpo anti-BrdU (considerándose a dicha célula como positiva en este caso) respecto del total de células en cada campo.

Con ayuda de un microscopio óptico Nikon Microphot-FXA y, empleando en todos los casos la misma magnificación (10X) para la obtención de cada campo, procedimos al recuento de núcleos teñidos considerados como positivos.

De este modo hicimos un recuento del número de células neuroepiteliales positivas para BrdU (ver Fig.15) en cada uno de los 40 campos microscópicos elegidos al azar por cada muestra.

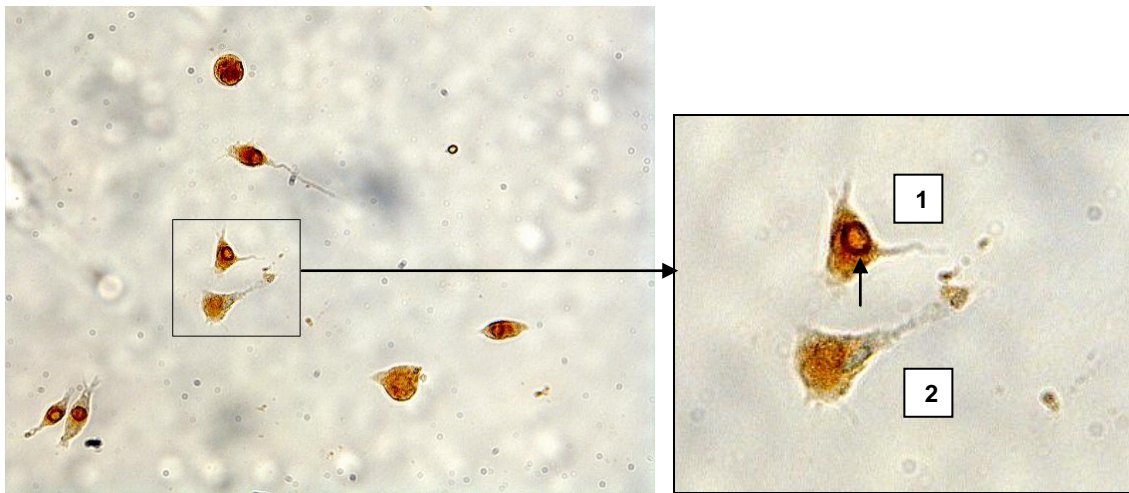


Fig. 15. Células BrdU positiva (1) y BrdU negativa (2)

5.3) Estudio de la diferenciación celular: Conteo de células β -III-Tubulina positivas

Para la identificación de las células β -III-Tubulina positivas y al igual que en el caso anterior, hemos obtenido imágenes tomadas con un microscopio óptico Nikon Microphot-FXA, empleando en todos los casos la misma magnificación (10X).

Para valorar la diferenciación celular en cada condición experimental, contamos con 12 muestras distintas de al menos 3 experimentos diferentes.

En el análisis cuantitativo, se consideraron positivas aquellas células que presentaban un núcleo negativo rodeado por un citoplasma positivo.

Así en este caso hicimos un recuento del número de células neuroepiteliales marcadas con β -III-Tubulina en su citoplasma (ver Fig.16), analizando 40 campos microscópicos elegidos al azar por cada muestra.

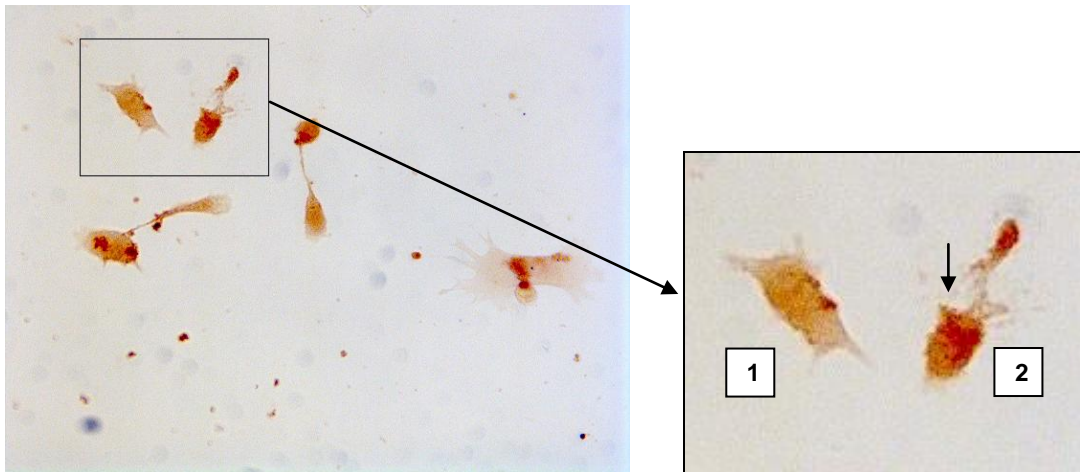


Fig. 16. Células β -III-Tubulina positiva (2) y β -III-Tubulina negativa (1)

RESULTADOS

Para valorar las diferencias de comportamiento de las células de mesencéfalo procedente de embriones de ratón de 11.5 días de gestación cultivadas bajo las tres condiciones experimentales música, ruido y silencio, que hemos definido previamente en material y métodos, planteamos el siguiente diseño experimental.

1. COMPORTAMIENTO CELULAR TRAS EXPOSICIÓN A MÚSICA, RUIDO O SILENCIO DURANTE 24 Ó 72 HORAS

Tomando como referencia los datos que comentaremos en los sucesivos apartados, hemos planteado un estudio de duración variable de 24 y 72 horas para determinar si existe influencia en los resultados según sea el tiempo de aplicación del estímulo tomado, sin tener en cuenta la posible transmisión de sonidos o vibraciones a través de la cámara de cultivo.

Para el estudio del comportamiento celular nos basamos en los tres parámetros descritos en material y métodos, es decir, supervivencia celular (valorada con la técnica de T.U.N.E.L.), replicación celular (valorada con la técnica de detección de BrdU inmunohistoquímicamente) y la diferenciación neuronal temprana (medida por la expresión de β -III-Tubulina).

Dado que hemos encontrado diferencias significativas en función de la duración del estímulo, comentaremos por separado los resultados a 24 y 72 horas, realizando una valoración conjunta posteriormente.

1.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio

1.1.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) 24 horas

A las 24 horas de cultivo, la supervivencia celular medida por la técnica de T.U.N.E.L., que marca las células que entran en apoptosis, revela la existencia de un considerable número de células marcadas en todas las condiciones de cultivo (ver Fig. 1, 2 y 3), variando el % de dichas células entre el 35% y el 50% de las células cultivadas.

Sin embargo el análisis estadístico, ANOVA (ver Tabla 1), señala que las diferencias que se pueden apreciar en el Gráfico 1 entre las distintas condiciones experimentales no son significativas ($p > 0'05$). Este resultado indica que en las fases tempranas de cultivo se da una inducción de la muerte celular inespecífica debida posiblemente a la manipulación del tejido o la adaptación de las células a su nuevo entorno.

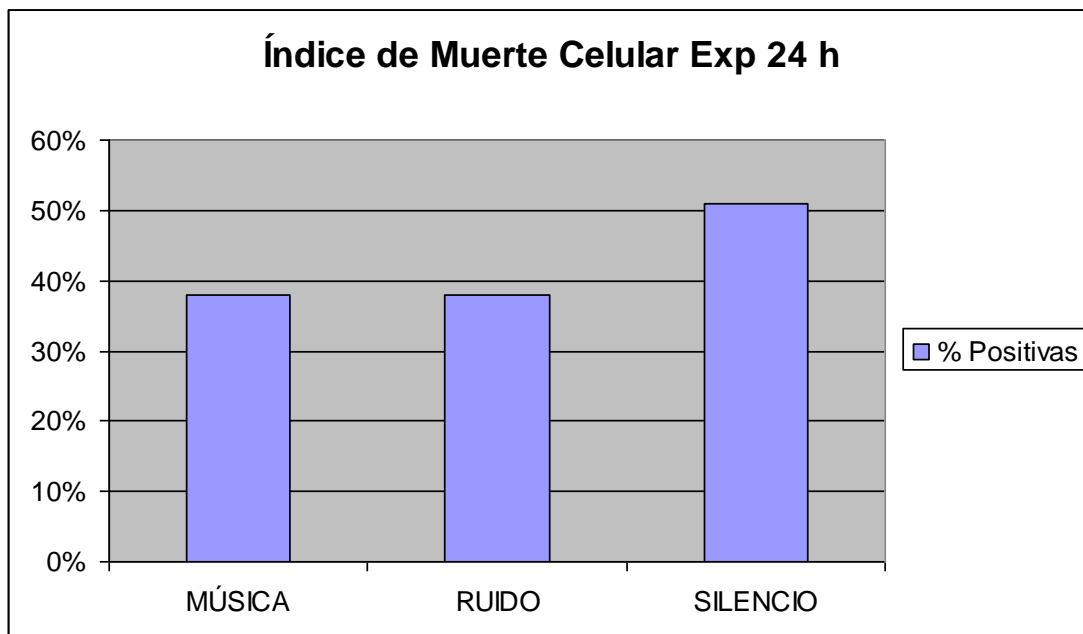


Gráfico 13. Índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio

| ANOVA RESULTS | | |
|------------------|----------|----|
| No. of subjects: | 125 | |
| No. of groups: | 3 | |
| | Group | N |
| 1 | silencio | 43 |
| 2 | ruido | 46 |
| 3 | música | 36 |
| df between | 2 | |
| P = | 0,0953 | |

Tabla 6. Anova de las diferencias en el Índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio con $p > 0'05$

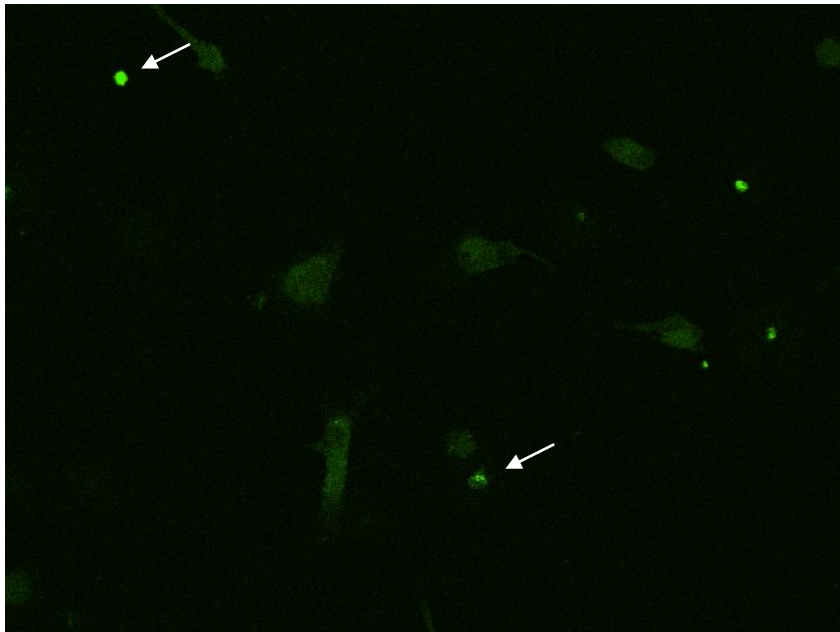
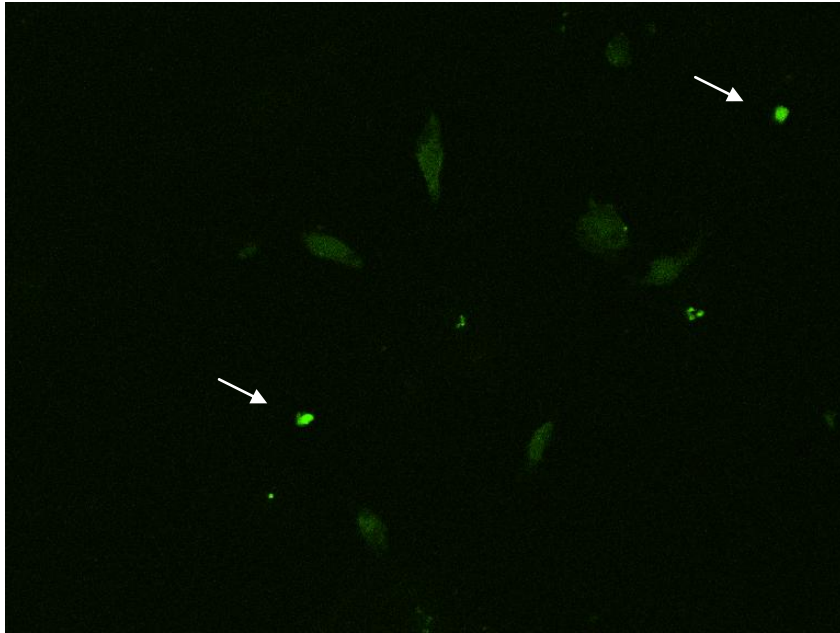


Fig. 17. 24h T.U.N.E.L. Música

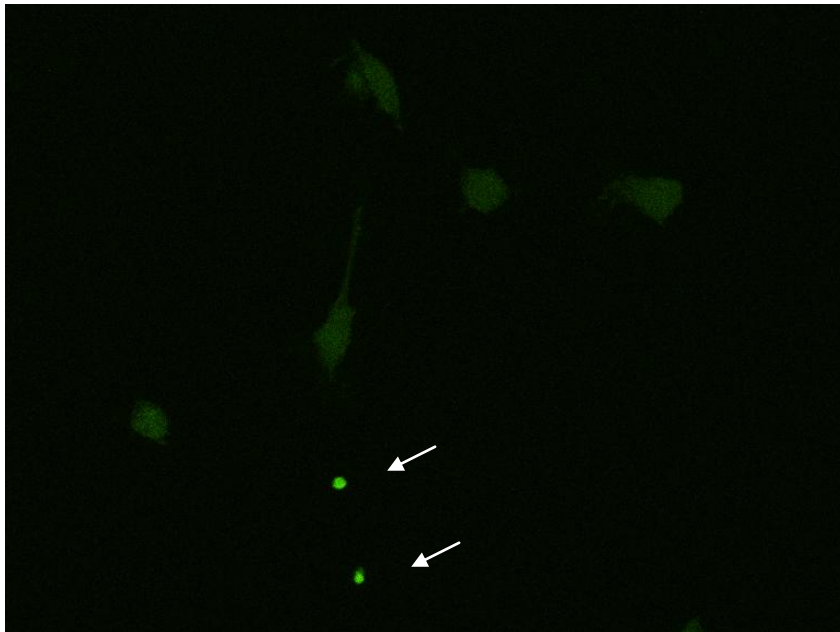
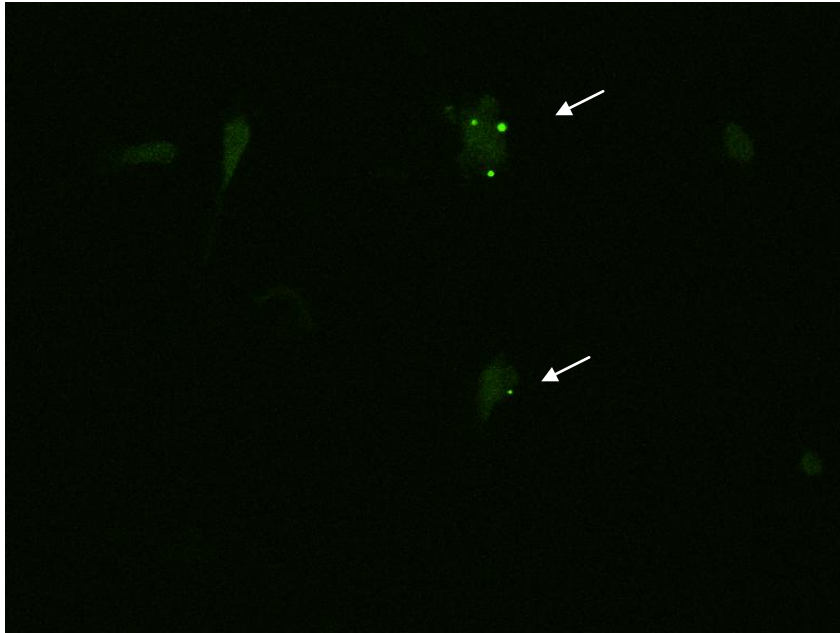


Fig. 2. 24h T.U.N.E.L. Ruido

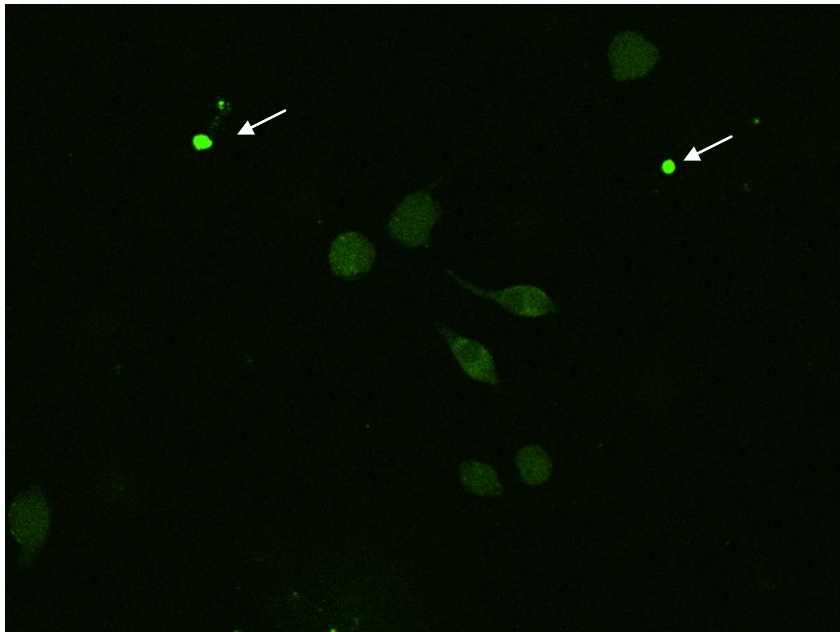


Fig. 3. 24h T.U.N.E.L. Silencio

1.1.2) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) 72 horas

La exposición del cultivo a las mismas condiciones experimentales pero durante un periodo mayor de tiempo (72 horas) revela la existencia cambios significativos respecto de los cultivos cortos (ver Tabla 2 y Fig. 4, 5 y 6).

En términos generales el número total de células apoptóticas detectado por la técnica de T.U.N.E.L. en cultivos de 72 horas disminuye con respecto a los cultivos de 24 horas (como se aprecia en el Gráfico 2). Mientras que en el estudio a 24 horas el promedio de células apoptóticas por campo está en torno al 50%, a las 72 horas se reduce hasta un 35%. Por otra parte, el número de células apoptóticas en los cultivos expuestos a música presenta una drástica reducción con respecto a las células expuestas a ruido y silencio, llegando a ser de casi el 50% con respecto del silencio, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la condición de ruido, como estímulo sonoro, no se aprecian diferencias significativas con respecto del silencio en el número de células apoptóticas (ver Gráfico 2 y Tabla 2).

En conclusión, las células cultivadas según la técnica descrita parecen sufrir un proceso de adaptación al medio (como se aprecia en el estudio a 24 horas) tras el cual el porcentaje de muerte celular inespecífica (no causada por las condiciones experimentales) disminuye. Transcurrido dicho periodo de adaptación, los datos revelan que la música como estímulo físico aplicado a las células mesencefálicas en cultivo mejora significativamente la supervivencia celular con respecto a las condiciones de silencio y ruido. Por el contrario, el estímulo sonoro no organizado (ruido) no ejerce efectos positivos sobre la supervivencia celular.

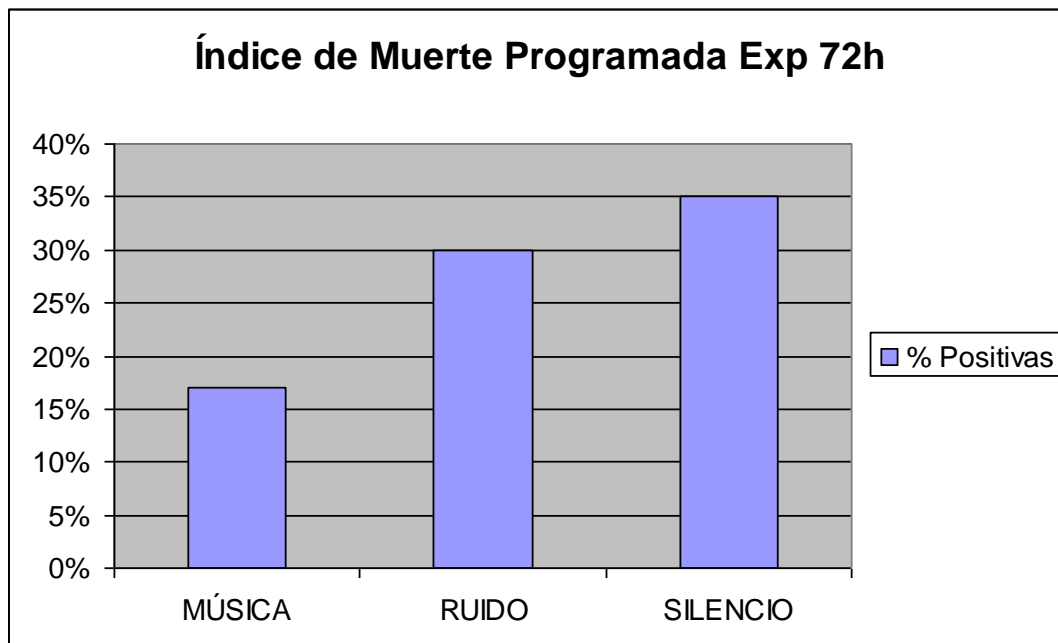


Gráfico 14. Índice de muerte celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------|--------|------------|
| No. of subjects: | 162 | | | | |
| No. Of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 63 | | | |
| 2 | ruido | 49 | | | |
| 3 | música | 50 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 0,0032 | <-- significant | | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | silencio | música | significant | 0,0012 | 0,0167 |
| 2 | ruido | música | significant | 0,0086 | 0,025 |
| 3 | silencio | ruido | NS | 0,6494 | 0,05 |

Tabla 7. Anova de las diferencias en el índice de muerte celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio: $p < 0,05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra que las diferencias significativas se dan entre silencio-música y ruido-música

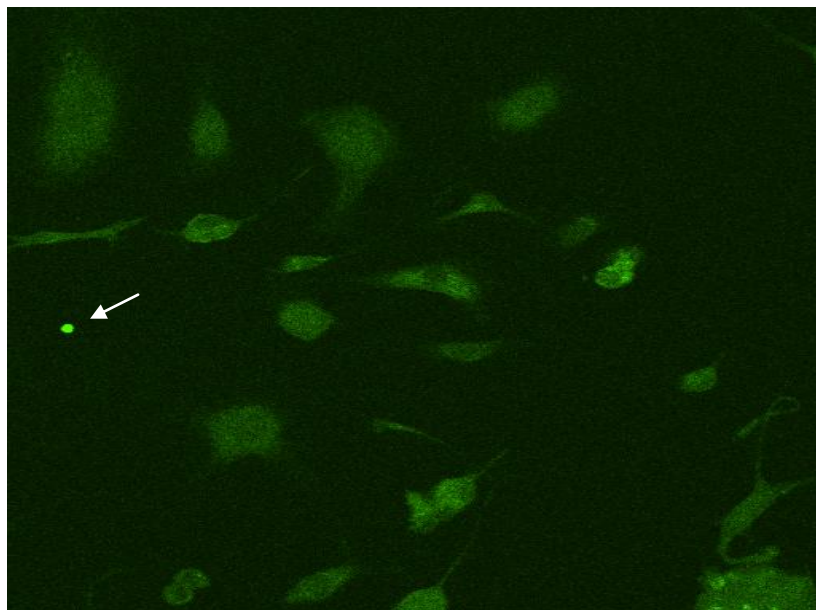
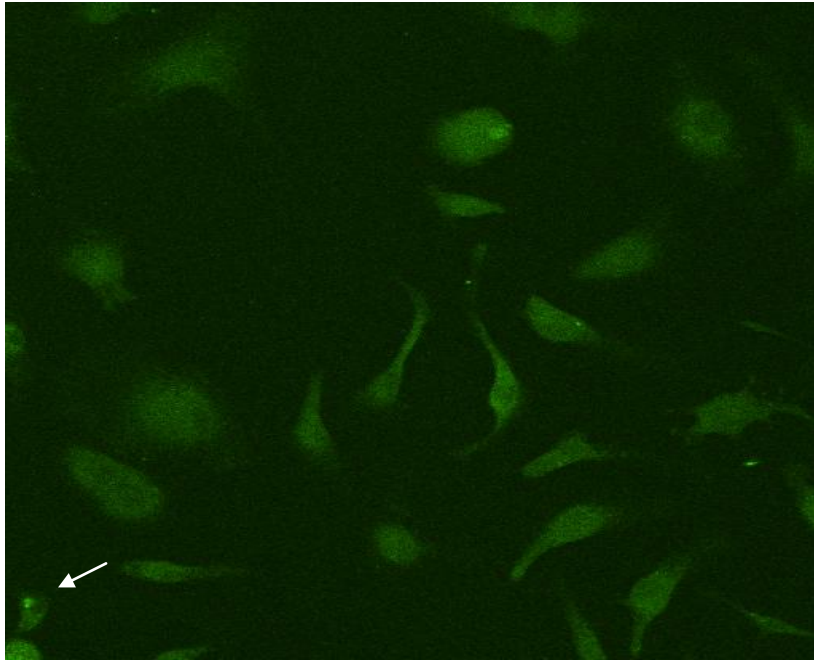


Fig. 20. 72h T.U.N.E.L. Música

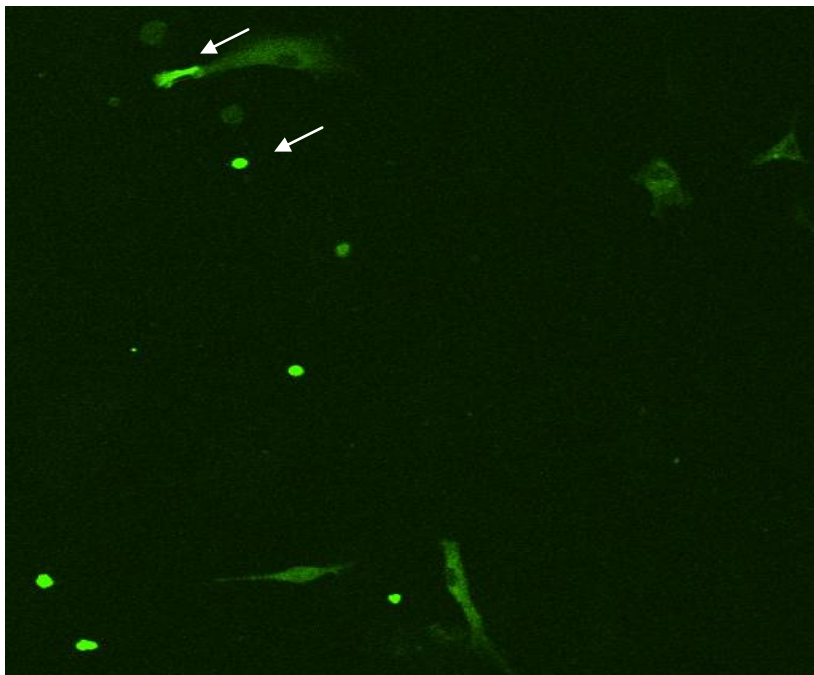
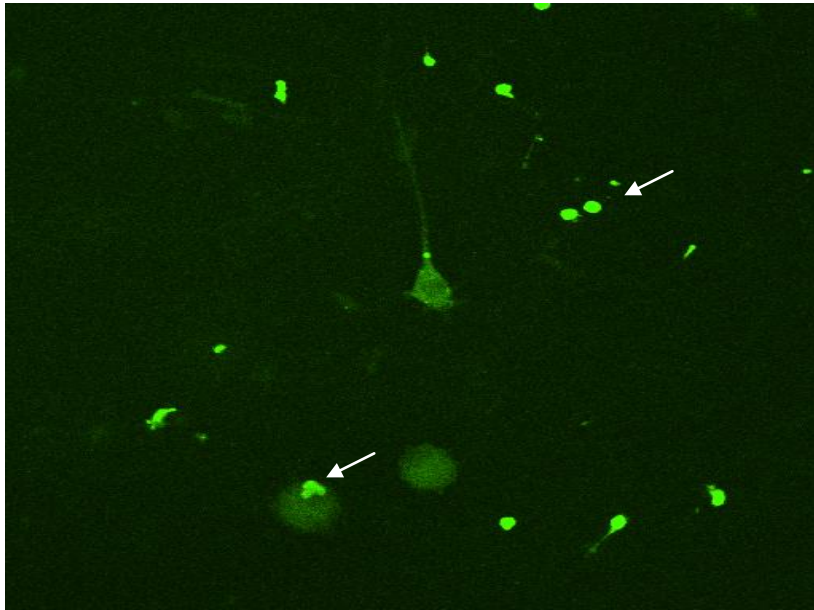


Fig. 21. 72h T.U.N.E.L. Ruido

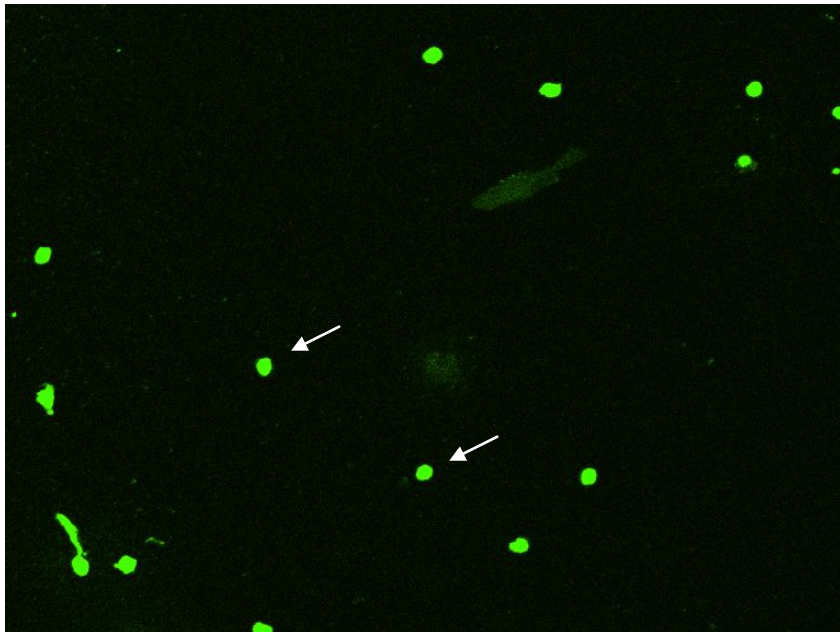
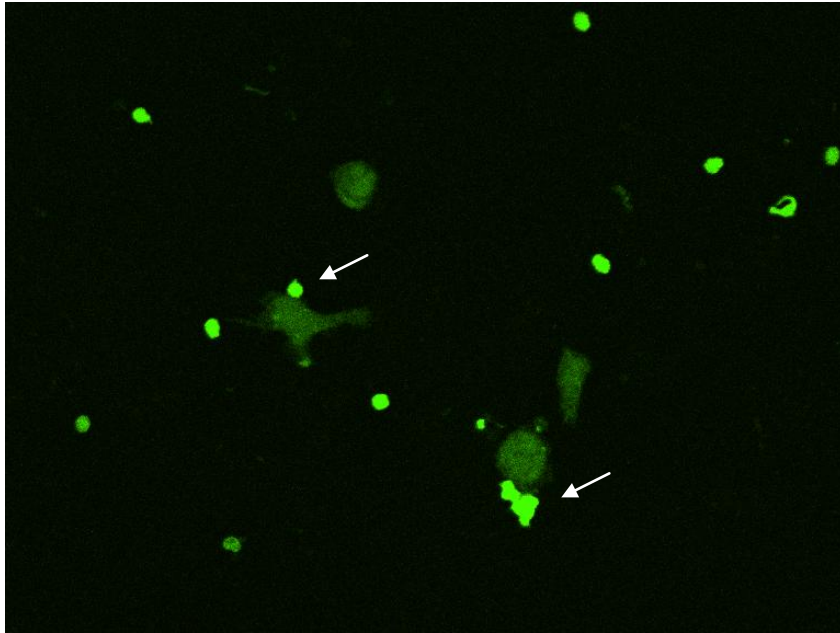


Fig. 22. 72 h T.U.N.E.L. Silencio

1.2) Índice de replicación celular a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio

1.2.1) Índice de replicación celular 24 horas

Para comprobar si la influencia que hemos detectado de los estímulos sonoros sobre el proceso de supervivencia celular se corresponde también con una influencia sobre otros procesos celulares activos, como la replicación y la diferenciación celular, hemos valorado la capacidad de replicación de las células mesencefálicas en cultivo mediante la incorporación de BrdU que indica la síntesis activa de DNA (ver Fig. 7, 8 y 9). Como hemos comentado en el capítulo de material y métodos (ver material y métodos apartado “5.2”) no valoramos la intensidad del marcaje sino el número de células que incorporan en sus núcleos una cantidad apreciable de BrdU. Como puede observarse en el Gráfico 3, a las 24 horas de cultivo las células expuestas a la condición de silencio revelan un nivel de BrdU que consideramos como referencia o control para las distintas condiciones experimentales desarrolladas. En el Gráfico 3 se puede apreciar así mismo que la aplicación de música a éste cultivo incrementa notablemente (en torno al 14%) el número de células BrdU positivas con respecto a los cultivos en la condición de silencio, siendo el incremento estadísticamente significativo (ver Tabla 3). Por otra parte llama la atención el hecho de que la aplicación de un sonido (que hemos definido como “ruido”) similar en parámetros pero “desorganizado”, provoca un significativo descenso (ver Tabla 3) en el número de células BrdU positivas cercano al 33% con respecto a la condición control silencio.

De estos datos se desprenden dos conclusiones:

1ª La música como estímulo físico es capaz de activar la replicación de las células mesencefálicas en cultivos cortos de 24 horas.

2ª Un estímulo sonoro comparable en parámetros a la música pero “desorganizado”, no sólo no ejerce dicho efecto activador de la replicación sino que parece inhibir, al menos parcialmente, la replicación en éstas células.

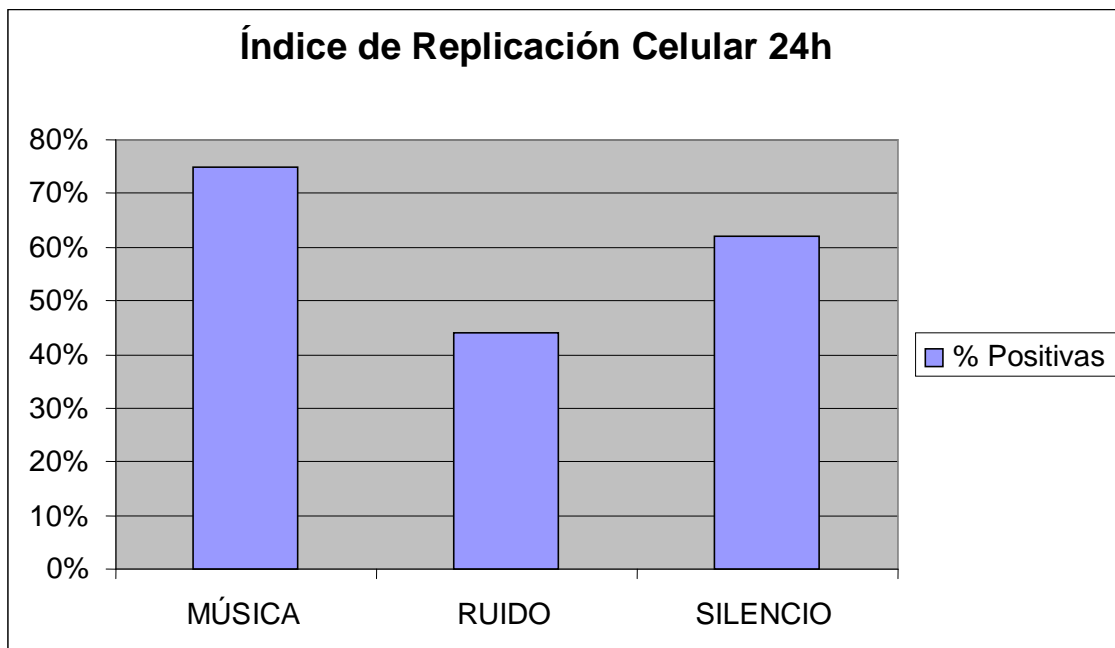


Gráfico 15. Índice de replicación celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------|----------|------------|
| No. of subjects: | 333 | | | | |
| No. of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 112 | | | |
| 2 | ruido | 111 | | | |
| 3 | música | 110 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 8,34E-01 | <-- significant | | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | ruido | música | significant | 2,45E+01 | 0,0167 |
| 2 | silencio | ruido | significant | 2,68E+09 | 0,025 |
| 3 | silencio | música | significant | 0,0008 | 0,05 |

Tabla 8. Anova de las diferencias en el índice de replicación celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio: $p < 0,05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra diferencias significativas entre las tres condiciones: ruido-música; silencio-ruido; silencio-música

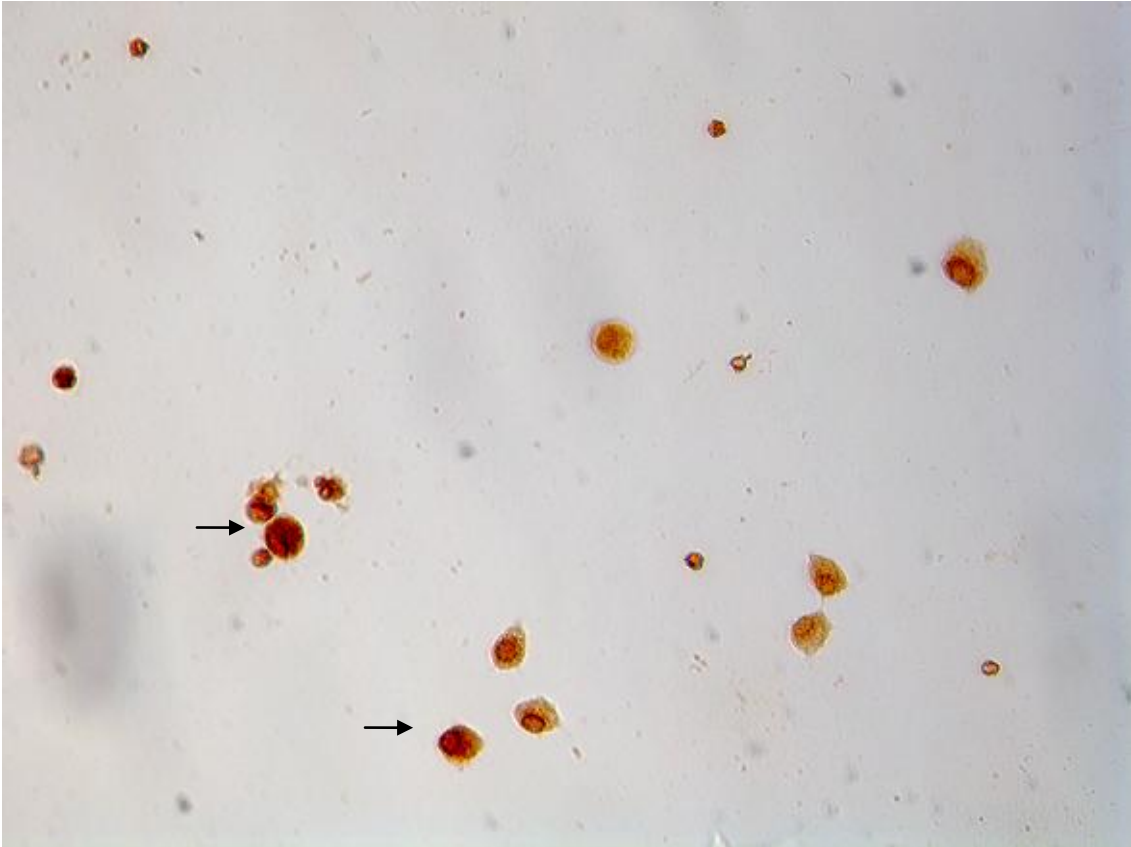
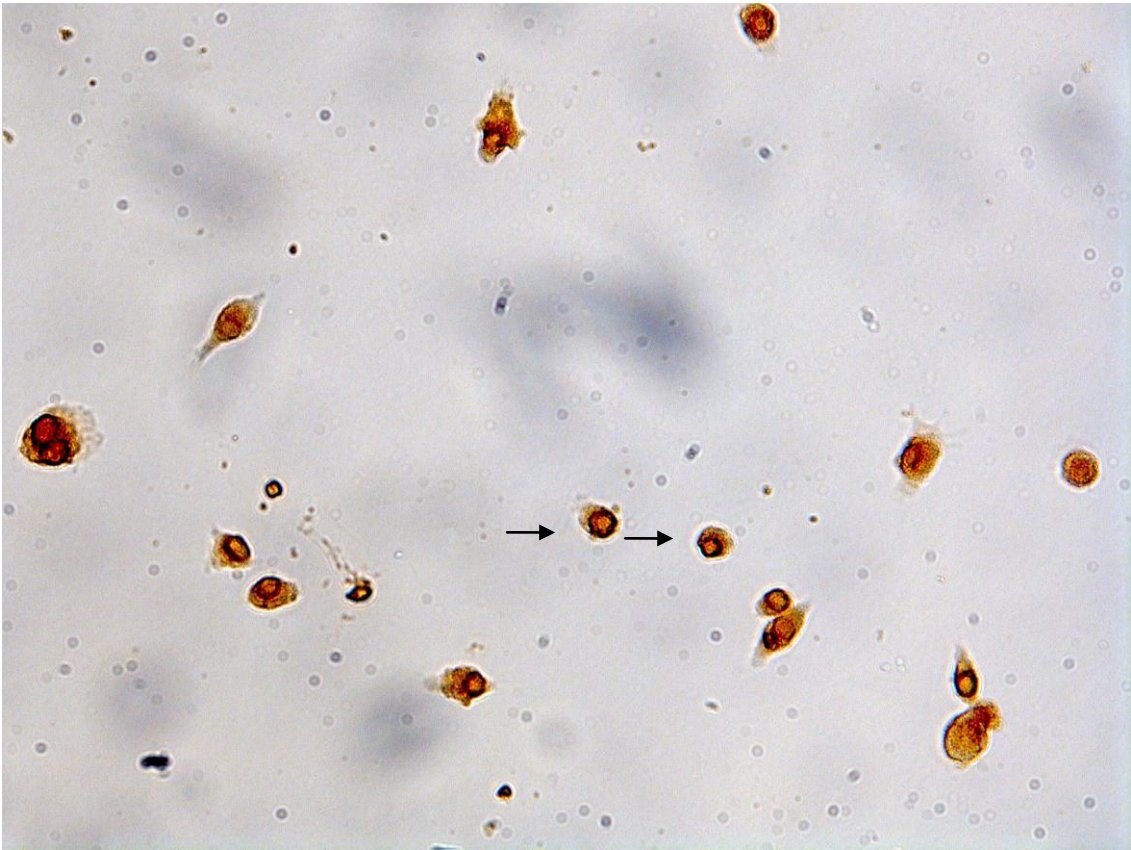


Fig. 23. 24h BrdU Música

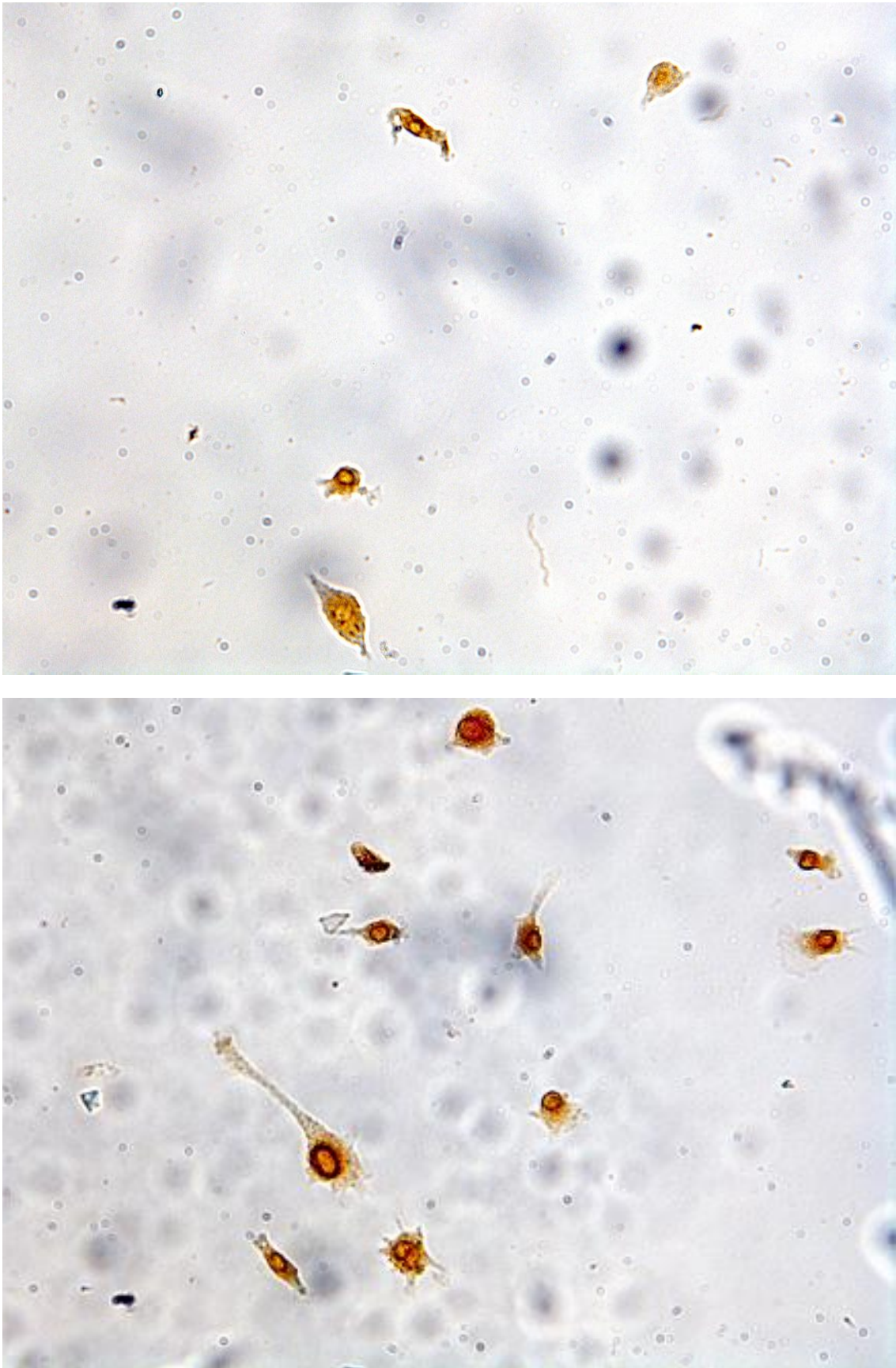


Fig. 24. 24h BrdU Ruido

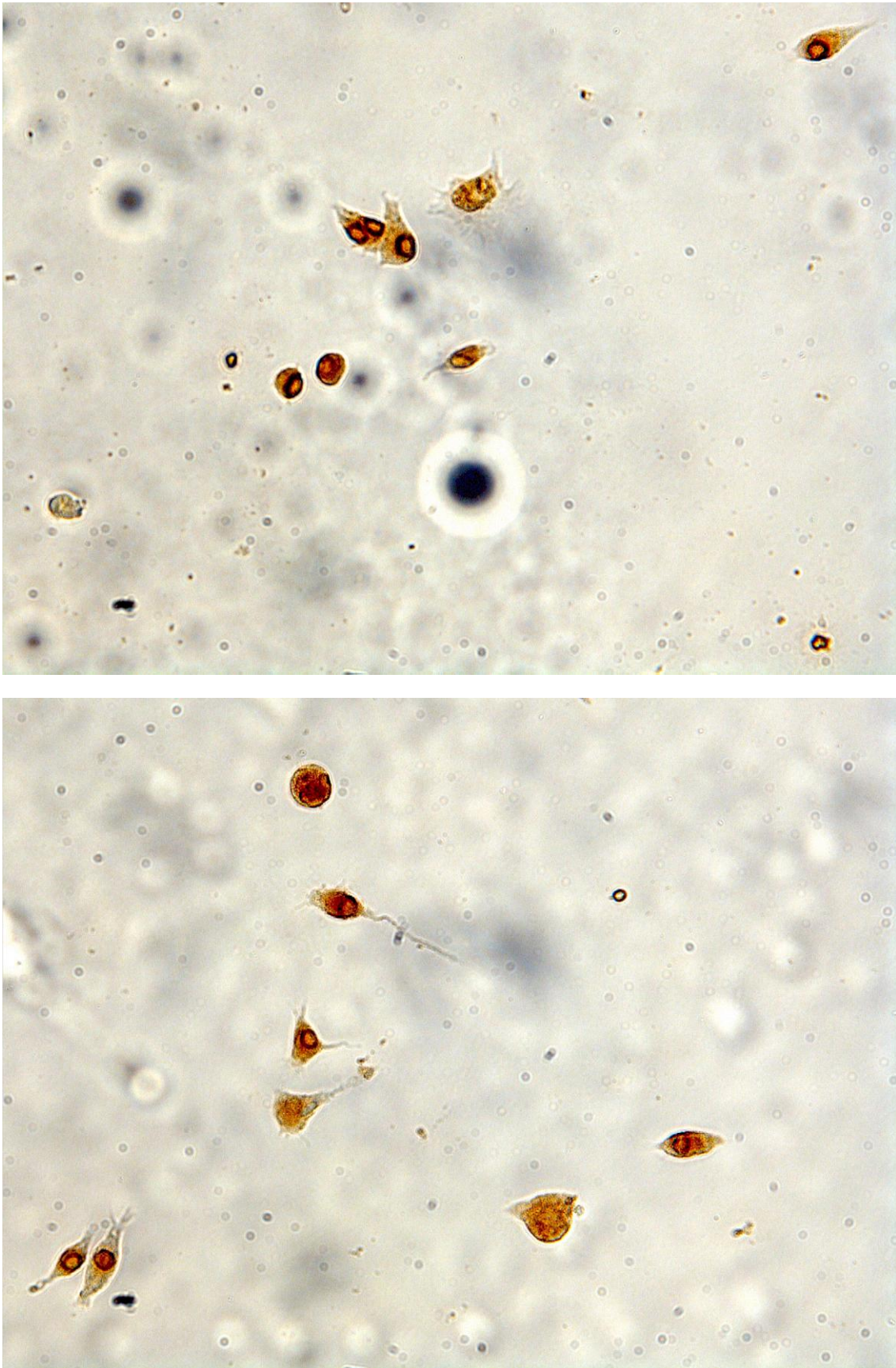


Fig. 25. 24h BrdU Silencio

1.2.2) Índice de replicación celular 72 horas

La valoración del efecto activador de la replicación celular a las 72 horas de cultivo demuestra, como se puede apreciar en el Gráfico 4, que la música incrementa el número de núcleos positivos con respecto al silencio, no siendo la diferencia significativa en éste caso. Sin embargo persiste una disminución significativa en cuanto al número de núcleos positivos para BrdU en la condición de ruido respecto a la de silencio (ver Tabla 4 y Fig. 10, 11 y 12).

Tomado en su conjunto, el análisis de replicación celular medido por la incorporación de BrdU indica que la música como estímulo físico es capaz de incrementar el nivel de replicación de las células en cultivo ejerciendo un efecto mitogénico específico. Esta capacidad mitogénica parece ser transitoria ya que, según nuestros datos, este incremento es evidente y significativo en las primeras 24 horas de cultivo, no siendo así a las 72 horas de cultivo. En la condición de ruido se aprecia una significativa inhibición de la replicación celular tanto a 24 como a 72 horas con respecto a la condición control de silencio, lo que sugiere que este tipo de estímulo sonoro inhibe el normal comportamiento mitogénico de estas células.

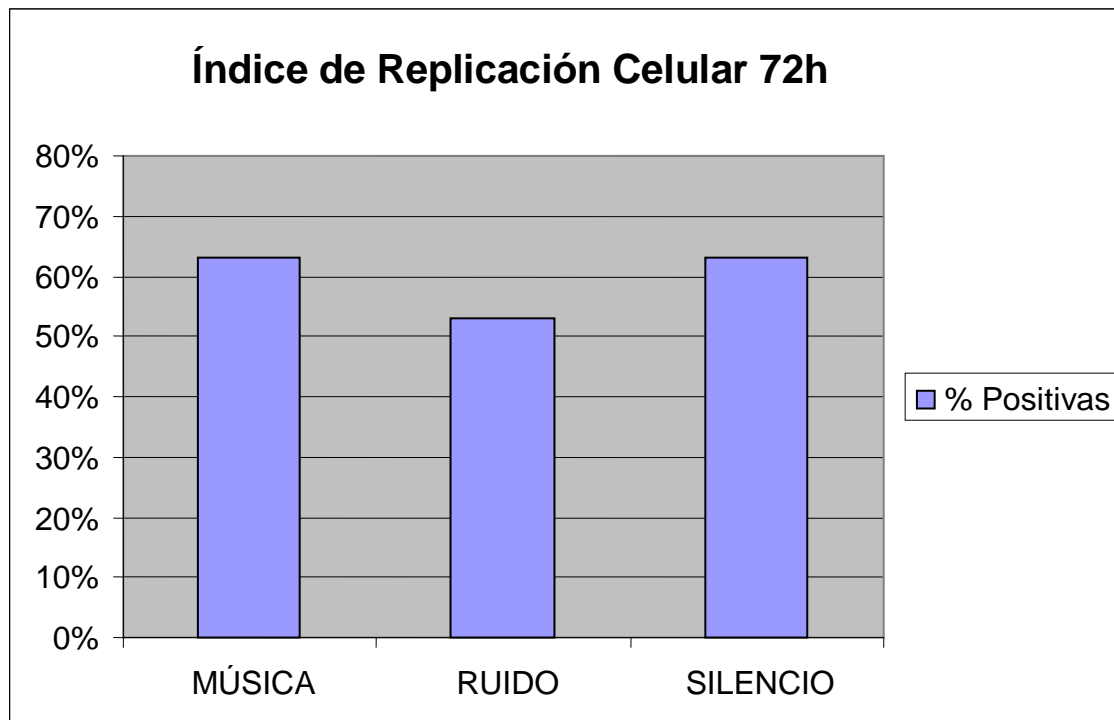


Gráfico 16. Índice de replicación celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------|----------|------------|
| No. of subjects: | 416 | | | | |
| No. of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 147 | | | |
| 2 | ruido | 133 | | | |
| 3 | música | 136 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 1,57E+08 | <-- significant | | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | ruido | música | significant | 3,95E+06 | 0,0167 |
| 2 | silencio | ruido | significant | 0,0003 | 0,025 |
| 3 | silencio | música | NS | 0,3371 | 0,05 |

Tabla 9. Anova de las diferencias en el índice de replicación celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio: $p < 0,05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra diferencias significativas entre ruido-música y silencio-ruido

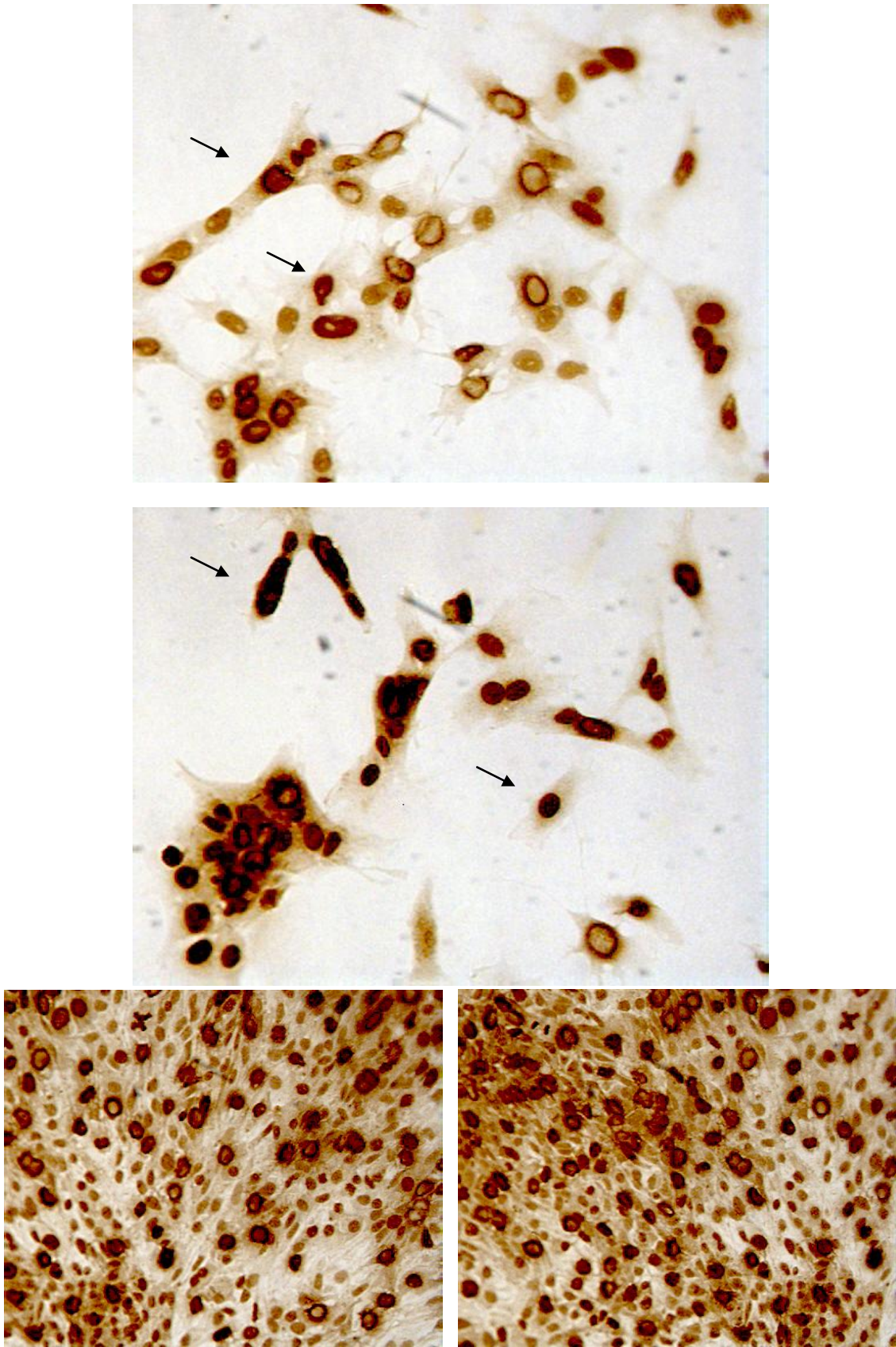


Fig. 26. 72h BrdU Música. Las dos fotos de la parte inferior muestran agrupaciones ocasionales de células expuestas a música marcadas con BrdU, en este caso descartadas en el conteo

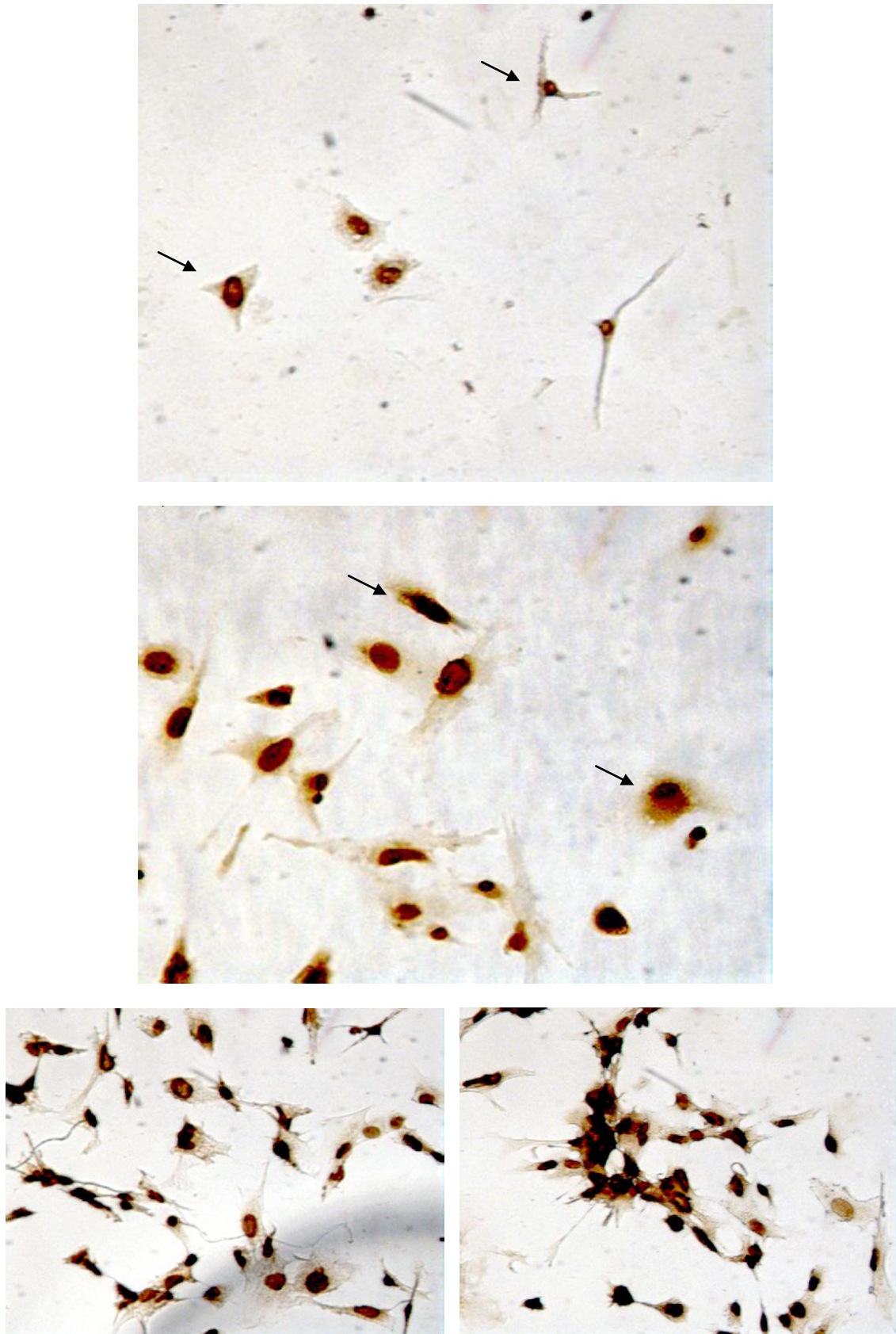


Fig. 27. 72h BrdU Ruido. Las dos fotos de la parte inferior muestran agrupaciones ocasionales de células expuestas a ruido marcadas con BrdU

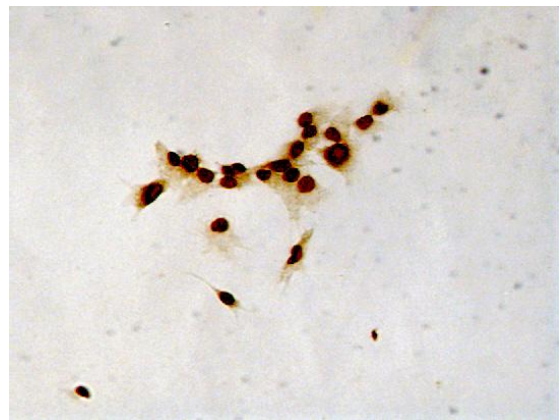
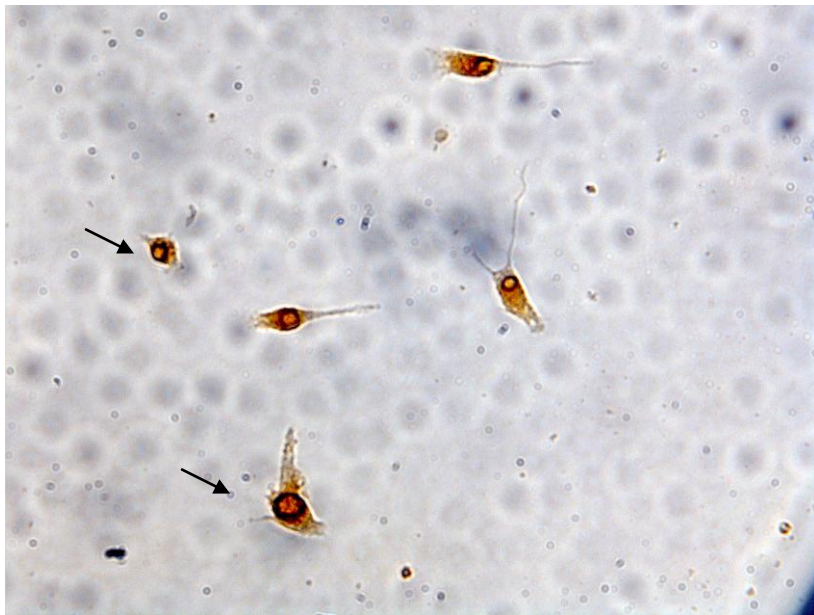
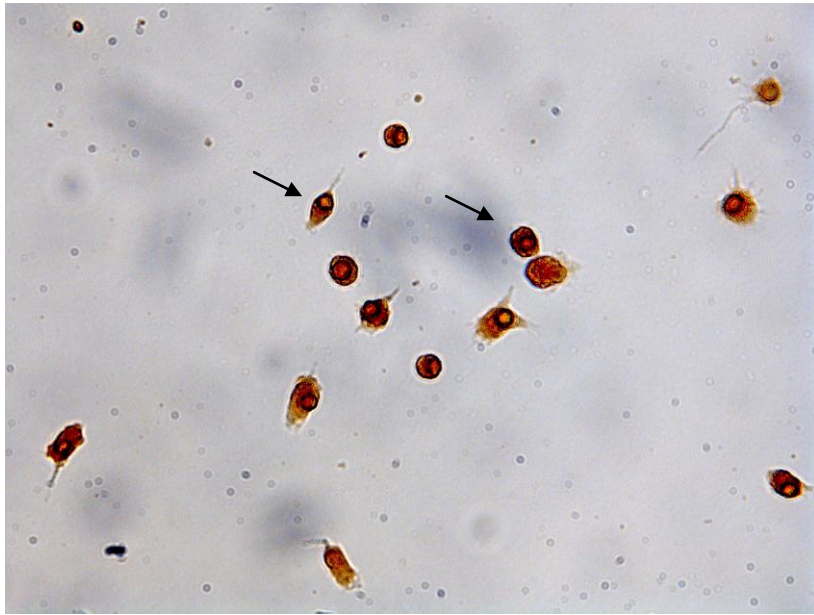


Fig. 28. 72h BrdU Silencio. Las dos fotos de la parte inferior muestran agrupaciones ocasionales de células en la condición control marcadas con BrdU

1.3) Índice de neurogénesis celular a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio

1.3.1) Índice de neurogénesis celular 24 horas

En el caso de la valoración del grado de diferenciación neuronal de las células mesencefálicas medida mediante la detección de β -III-Tubulina, nuestros resultados demuestran (ver Gráfico 5) que transcurridas 24 horas de cultivo existe un incremento en el número de células β -III-Tubulina positivas expuestas a la condición de música. Dicho incremento, según la valoración estadística realizada, es significativo con respecto a la condición control de silencio (ver Tabla 5).

Por otra parte llama la atención la notable y significativa disminución de células β -III-Tubulina positivas en los cultivos expuestos a la condición de ruido con respecto tanto a los expuestos al silencio como a la música (ver Tabla 5 y Fig. 13, 14 y 15).

Resulta también relevante la semejanza de estos datos con los descritos para BrdU en 24 horas, lo que parece indicar un comportamiento similar de los dos procesos celulares activos.

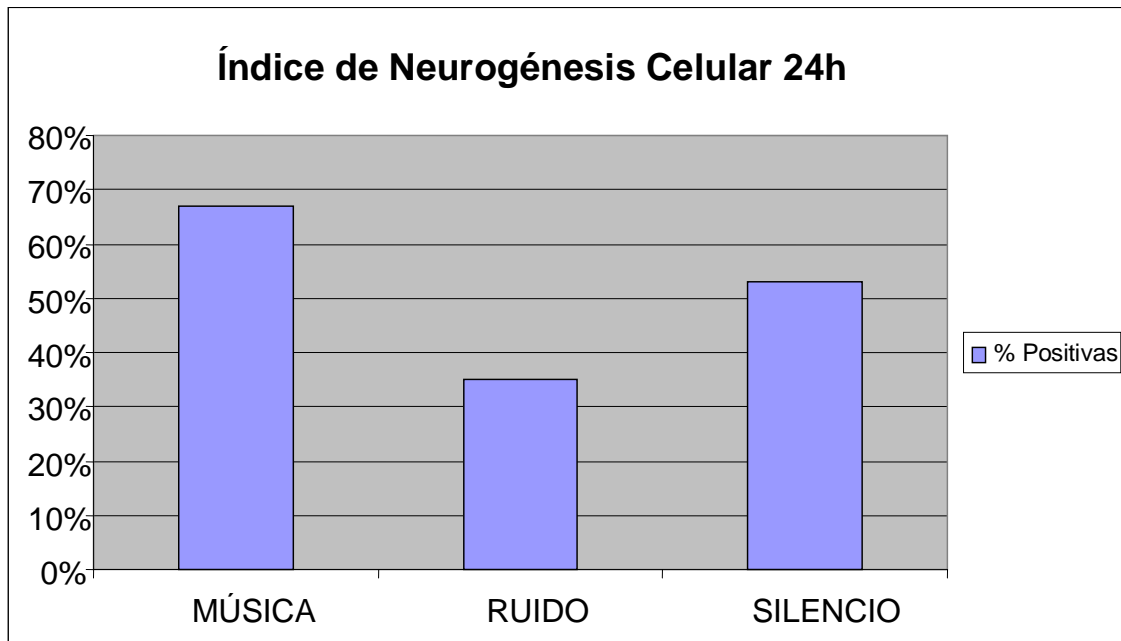


Gráfico 17. Índice de neurogénesis celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------|----------|------------|
| No. of subjects: | 331 | | | | |
| No. of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 104 | | | |
| 2 | ruido | 110 | | | |
| 3 | música | 117 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 5,50E+07 | <-- significant | | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | ruido | música | significant | 1,28E+07 | 0,0167 |
| 2 | silencio | ruido | significant | 0,0075 | 0,025 |
| 3 | silencio | música | significant | 0,0077 | 0,05 |

Tabla 10. Anova de las diferencias en el índice de neurogénesis celular tras 24 horas de exposición a música, ruido o silencio: $p < 0,05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales: ruido-música; silencio-ruido; silencio-música

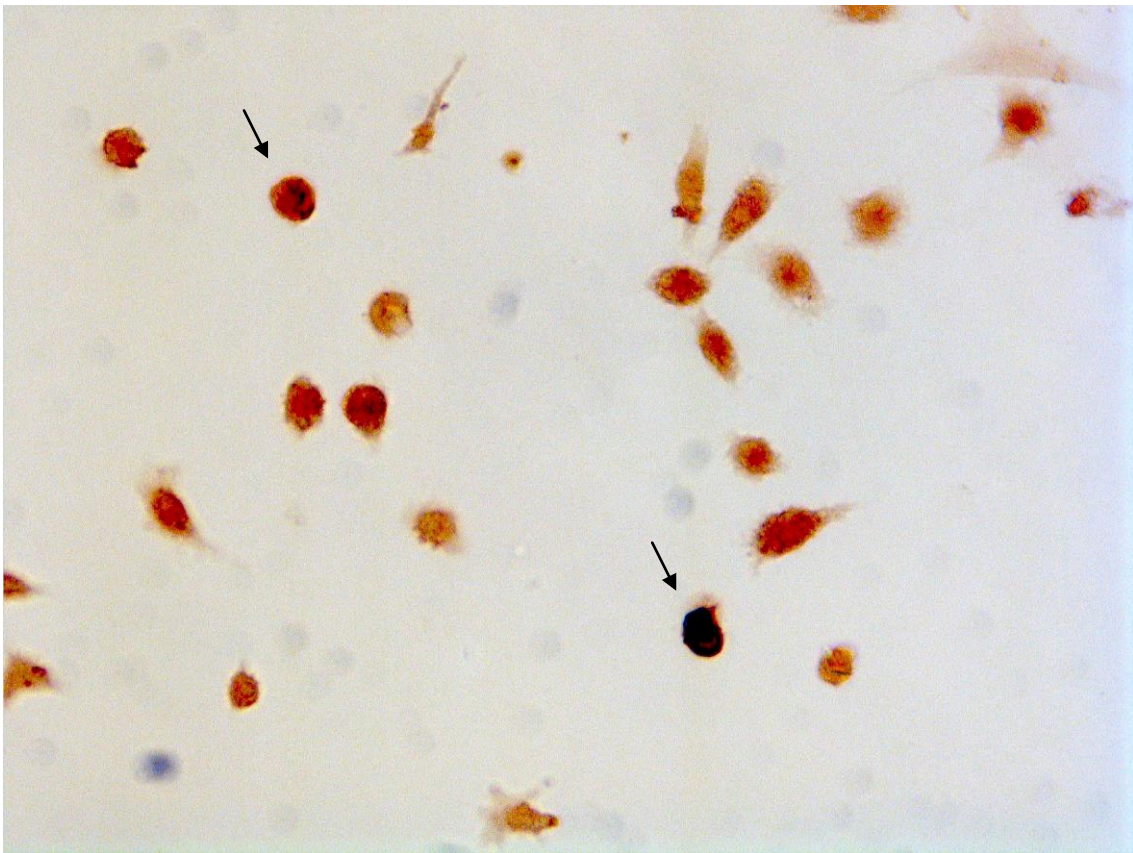
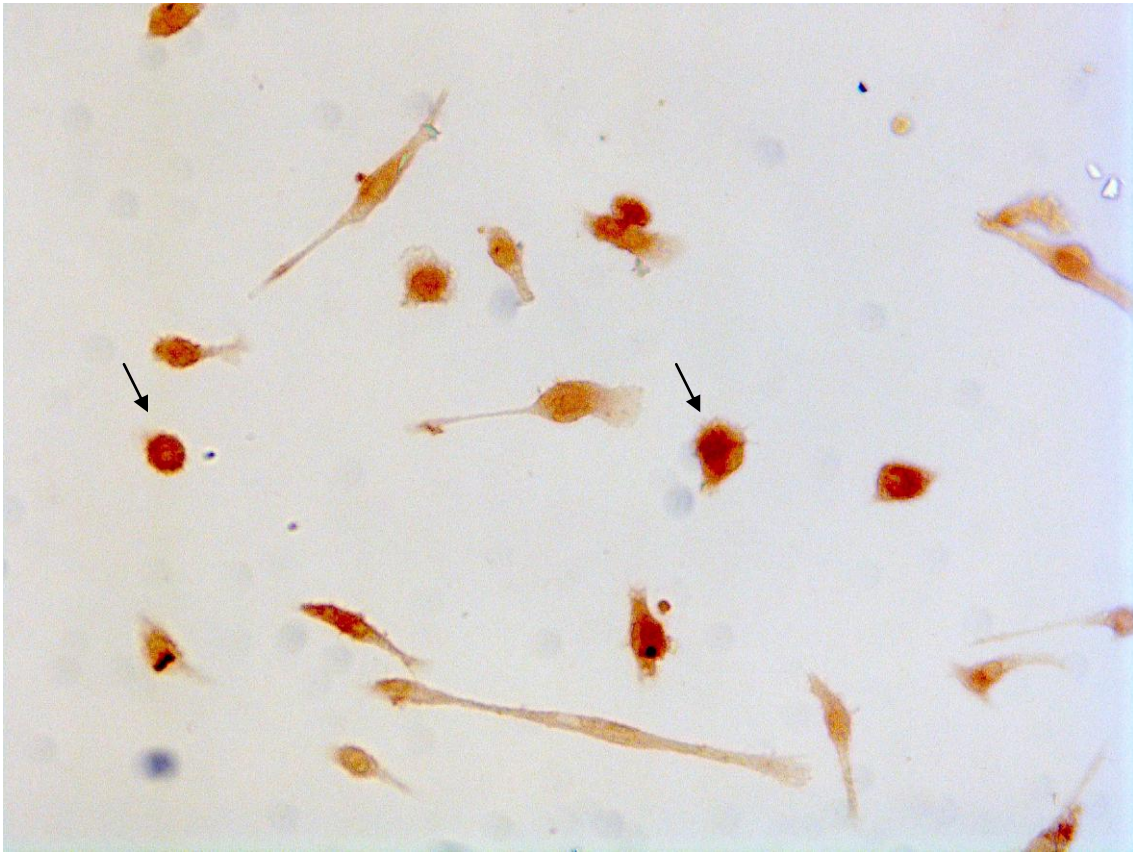


Fig. 29. 24h β -III-Tubulina Música

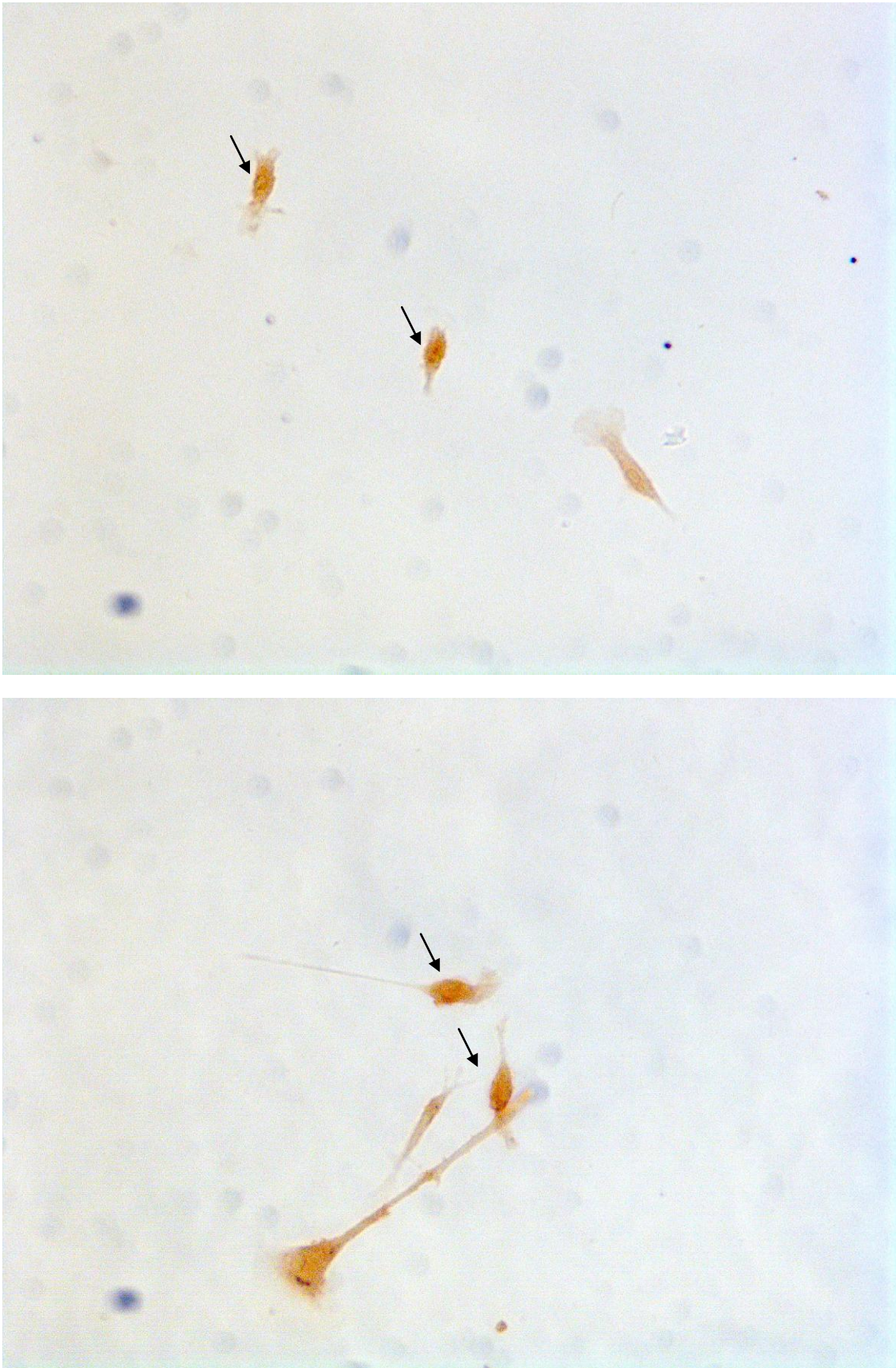


Fig. 30. 24h β -III-Tubulina Ruido

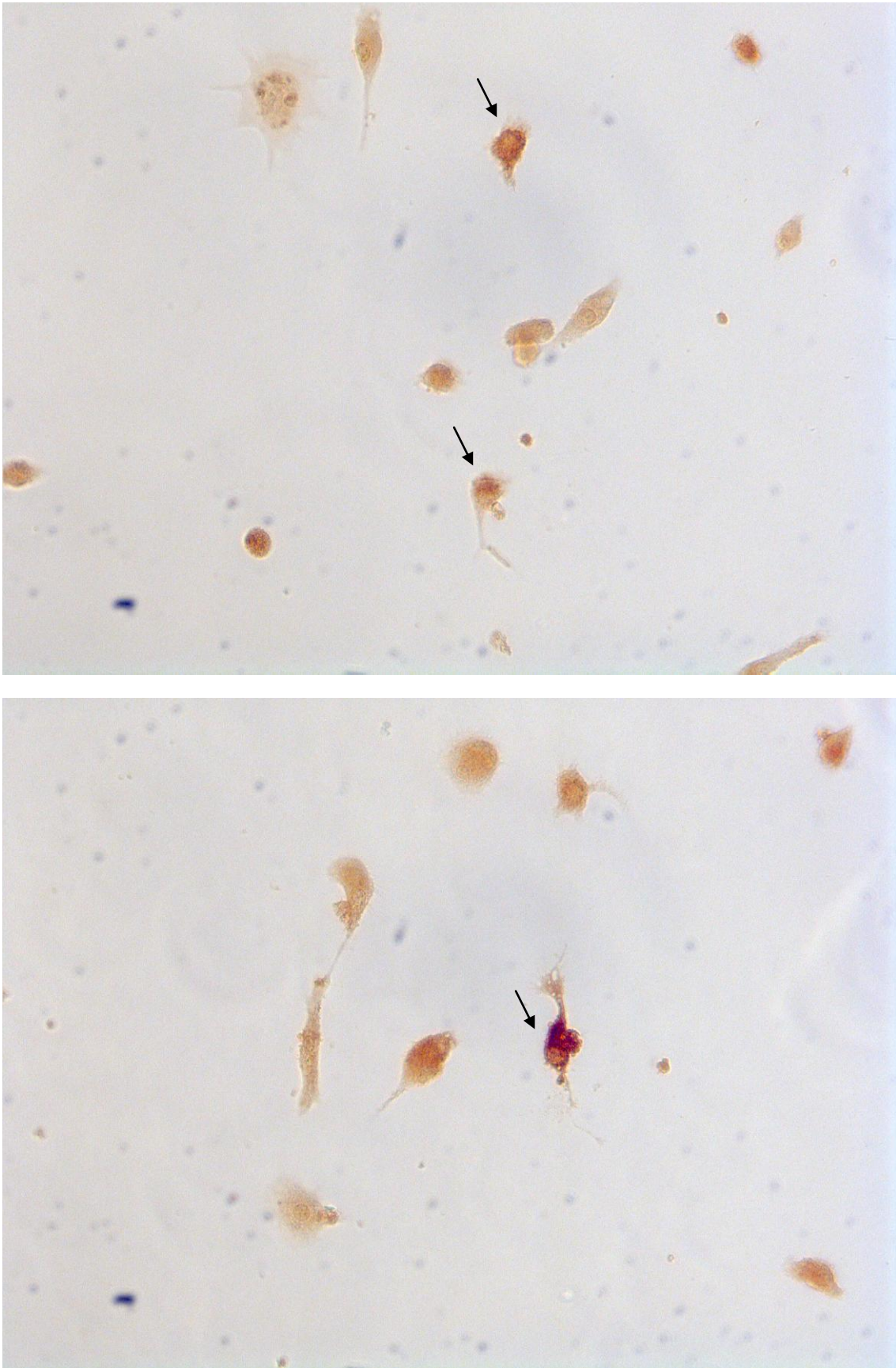


Fig. 31. 24h β -III-Tubulina Silencio

1.3.2) Índice de neurogénesis celular 72 horas

La valoración de la expresión de β -III-Tubulina en los cultivos a 72 horas (ver Gráfico 6) revela que el efecto activador de la neurogénesis ejercido por la música a las 24 horas decae notablemente, apreciándose un ligero incremento con respecto al efecto en la condición de silencio, que no resulta ser estadísticamente significativo. Sin embargo, sí persiste la disminución en el número de células β -III-Tubulina positivas en los cultivos expuestos a ruido con respecto a las otras dos condiciones experimentales (ver Fig. 16, 17, y 18) siendo dicha disminución estadísticamente significativa (ver Tabla 6).

Tomando en conjunto estos resultados, podemos afirmar que en el modelo biológico empleado, la música como agente físico ejerce una influencia en el comportamiento de las células precursoras de cerebro embrionario activando la neurogénesis. Este efecto es, por otra parte, mucho más evidente en las exposiciones cortas, como son los cultivos a 24 horas, que en las largas, 72 horas. Así mismo llama la atención el hecho de que el ruido como agente físico provoque una significativa disminución de la neurogénesis, éste efecto es además mantenido tanto a las 24 como a las 72 horas, por lo que parece ser un efecto permanente.

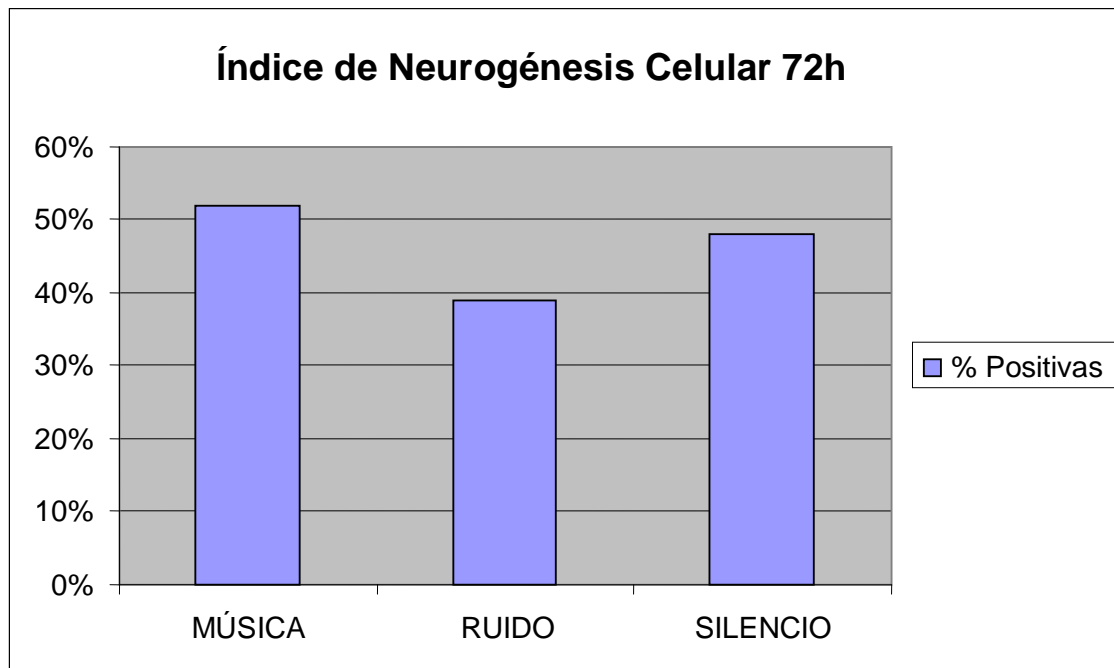


Gráfico 18. Índice de neurogénesis celular tras 72 horas de exposición a música, ruido o silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|---------|------------------|----------|------------|
| No. of subjects: | 468 | | | | |
| No. of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 158 | | | |
| 2 | ruido | 158 | | | |
| 3 | música | 152 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 2,74E+08 | | <-- significant! | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | ruido | música | significant | 1,03E+08 | 0,0167 |
| 2 | silencio | ruido | significant | 0,0001 | 0,025 |
| 3 | silencio | música | NS | 0,4299 | 0,05 |

Tabla 11. Anova de las diferencias en el índice de neurogénesis celular a las 72 horas de exposición a música, ruido o silencio: $p < 0,05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra diferencias significativas entre ruido-música y silencio-ruido

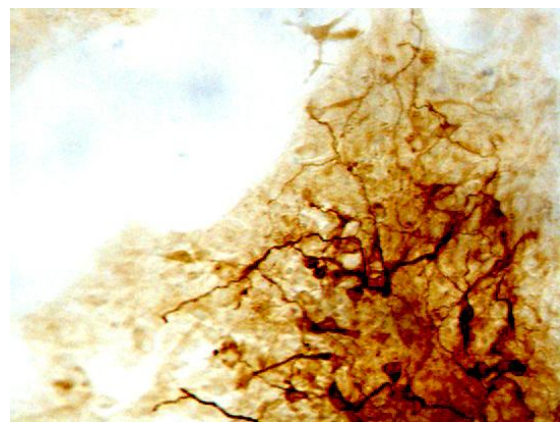
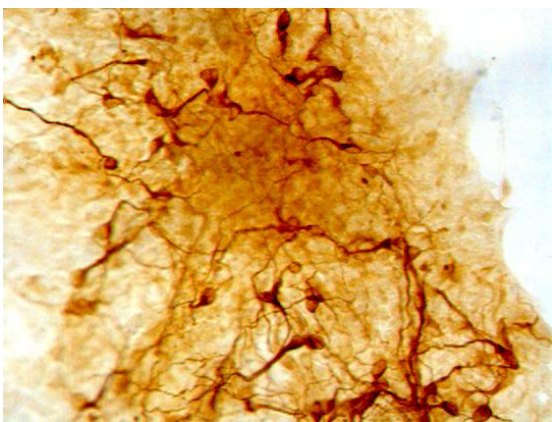
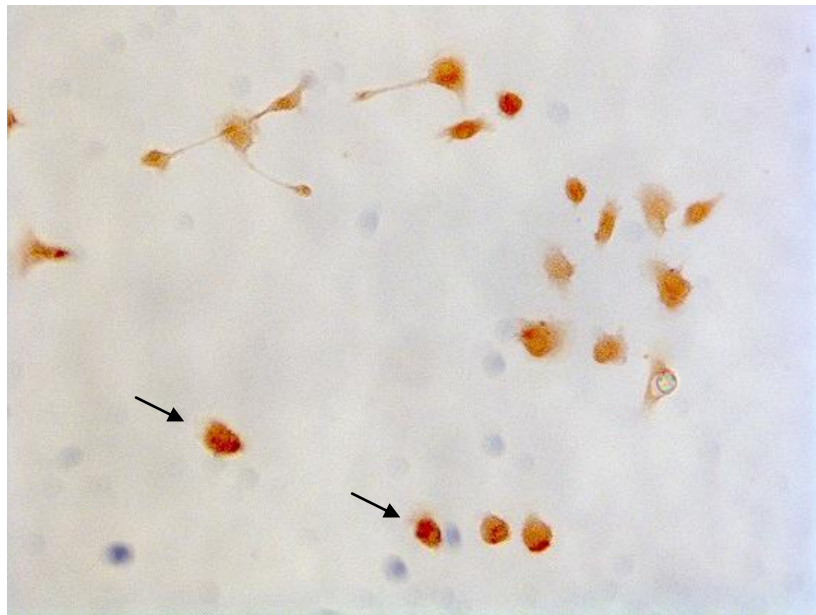
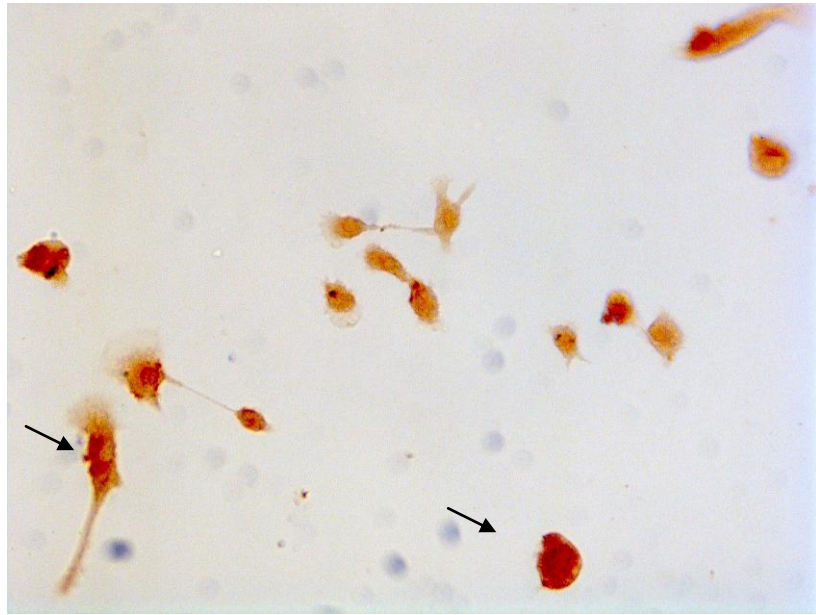


Fig. 32. 72h β -III-Tubulina Música. Las dos fotos de la parte inferior muestran agrupaciones ocasionales de células expuestas a música marcadas con β -III-Tubulina descartadas, en este caso, en el conteo

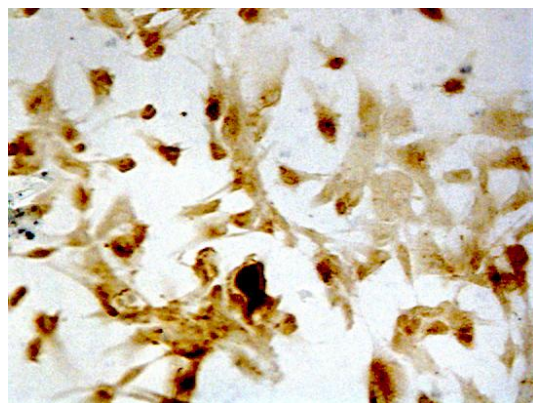
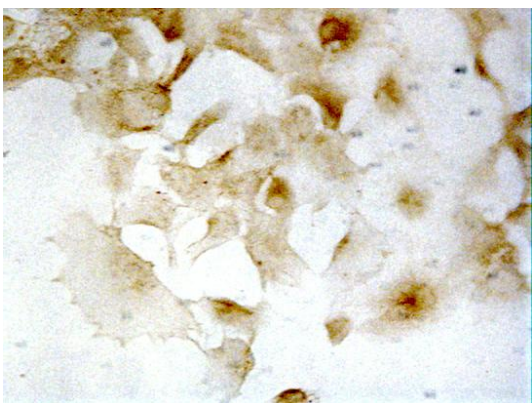
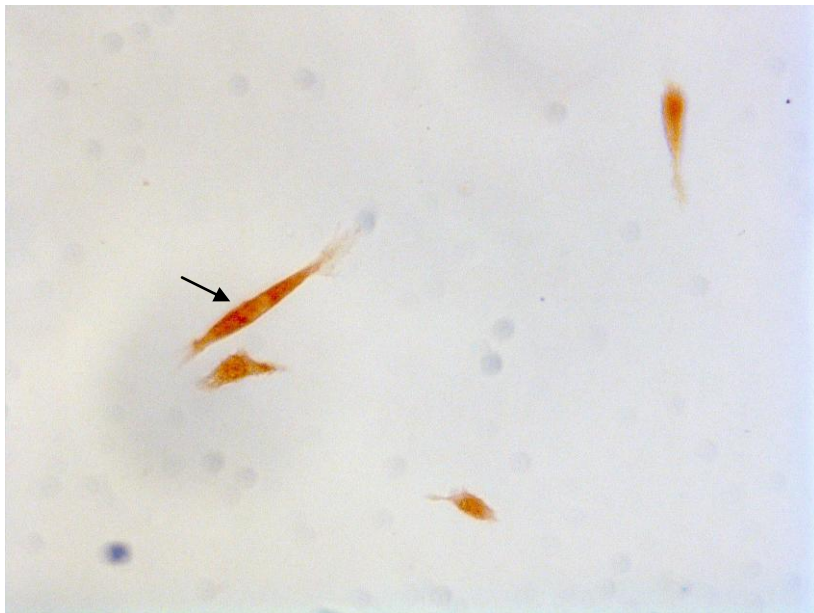
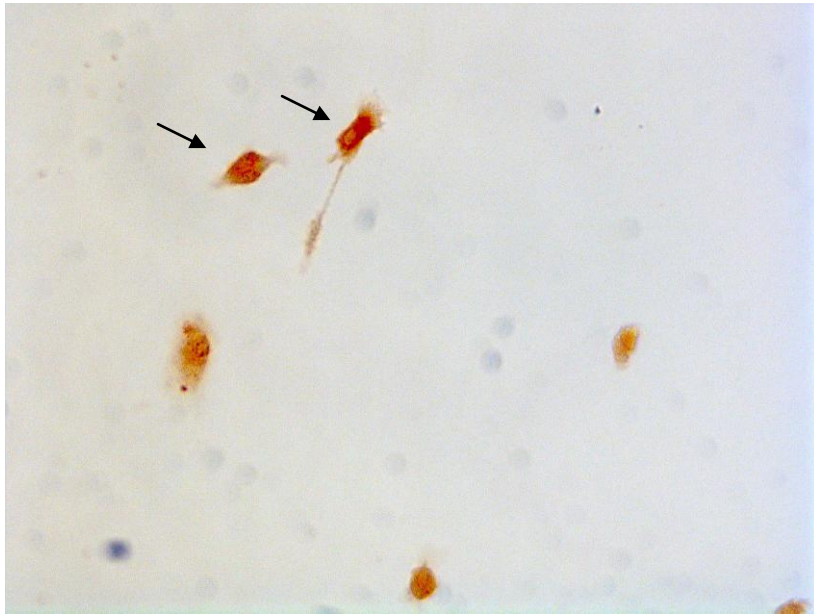


Fig. 33. 72h β -III-Tubulina Ruido. Las dos fotos de la parte inferior muestran agrupaciones ocasionales de células expuestas a ruido marcadas con β -III-Tubulina, en este caso, descartadas en el conteo

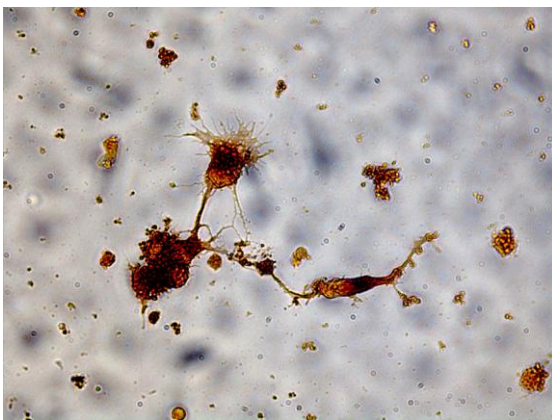
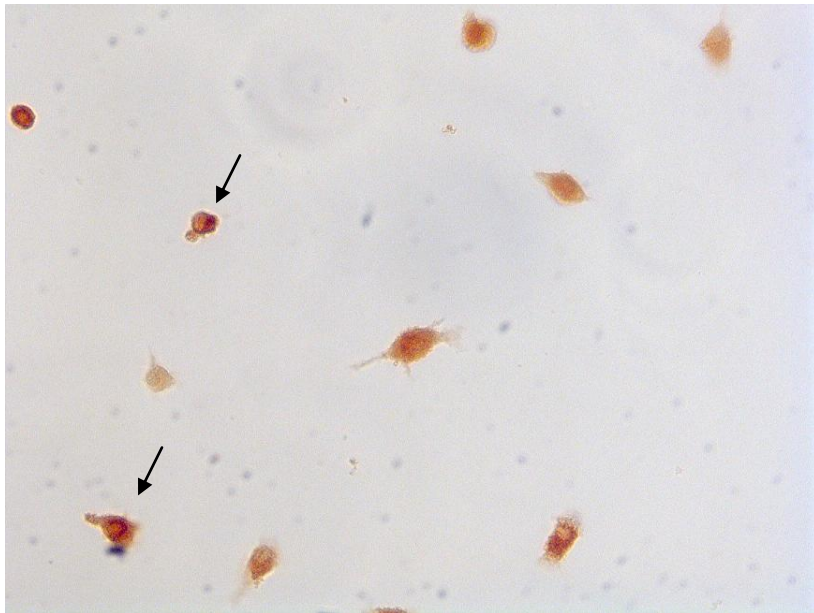
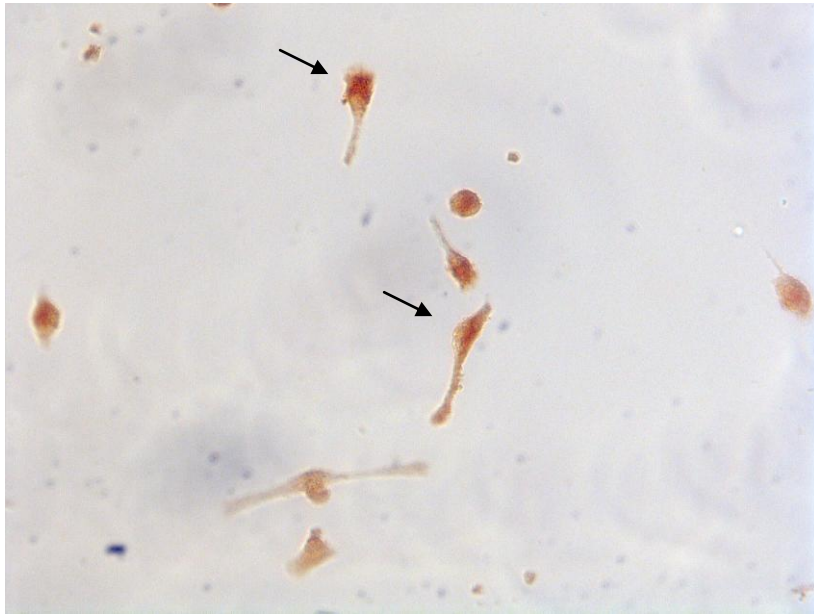


Fig. 34. 72h β -III-Tubulina Silencio. Las dos fotos de la parte inferior muestran agrupaciones ocasionales de células expuestas a silencio marcadas con β -III-Tubulina

1.4) Comportamiento celular a las 24 y 72 horas de exposición a música, ruido o silencio: valoración final

Finalmente, la valoración del comportamiento celular en su conjunto sugiere que las células del mesencéfalo embrionario cultivadas “in Vitro” responden de forma específica a los estímulos sonoros modificando su comportamiento.

De un lado, la música ejerce un efecto permanente mejorando la supervivencia celular y un efecto agudo, pero transitorio, sobre los procesos de replicación y diferenciación en sentido neuronal. Mientras que, por otro lado, el ruido no parece ejercer una influencia sobre la supervivencia celular y sin embargo, sí que ejerce un efecto claramente negativo tanto sobre la replicación como sobre la diferenciación de los precursores neurales. Dicho efecto es mantenido en el tiempo.

2. COMPORTAMIENTO CELULAR TRAS EXPOSICIÓN A MÚSICA, RUIDO O SILENCIO DURANTE 24 HORAS CON VIBRACIÓN VERSUS SIN VIBRACIÓN

El diseño experimental que hemos planteado implica la utilización de un espacio de cultivo celular cuyas paredes y soportes son de estructura metálica y es en su interior donde se genera el estímulo sonoro correspondiente. Frente a esto nos cuestionamos el hecho de que, teniendo en cuenta que el soporte del cultivo celular está en contacto con esta superficie de la cámara de cultivo, la vibración generada por la estructura metálica puede ejercer una influencia en el comportamiento celular distinta de la del estímulo sonoro transmitido exclusivamente por vía aérea.

Para tratar de resolver ésta cuestión hemos realizado una serie de experimentos complementarios con cultivos de 24 horas en los que, tal y como se describe en el capítulo de material y métodos (apartado “3.2”), las placas de cultivo celular se aíslan de la estructura metálica mediante un material absorbente de vibraciones que evita la transmisión mecánica de las mismas al cultivo celular.

2.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) con y sin vibración

Nuestros resultados indican que existe una disminución en el índice de muerte celular particularmente evidente y estadísticamente significativa al atenuar la vibración cuando el estímulo aplicado es la música (ver Gráfico 7). Como puede apreciarse en el mismo gráfico, en el caso del ruido existe una disminución discreta, aunque también significativa (ver Tabla 7), de células apoptóticas cuando eliminamos el componente vibratorio. En cuanto a la condición de silencio, tanto si están sometidas a vibración como si no, no hay diferencias en el número de células que entran en apoptosis (ver Gráfico 7 y Tabla 7).

Estos datos indican que, aunque no parece existir una variación sustancial en la muerte celular debida a la transmisión de sonido por vibración a través de las paredes de la cámara de cultivo, en condiciones de silencio y de ruido, sí se observa una mejora evidente en la supervivencia celular cuando el estímulo musical está desprovisto de vibraciones mecánicas (ver Fig. 19 a 24). De ello cabe deducir que el hecho de que exista una transmisión mecánica añadida a la transmisión aérea del estímulo sonoro afecta a la supervivencia celular al menos en las fases iniciales del cultivo.

Con esto podemos deducir que la música podría tener un potencial de mejora de la supervivencia celular mucho mayor del que hemos comentado previamente y que no llegaría a desarrollar debido al efecto concomitante de la vibración de la cámara de cultivo.

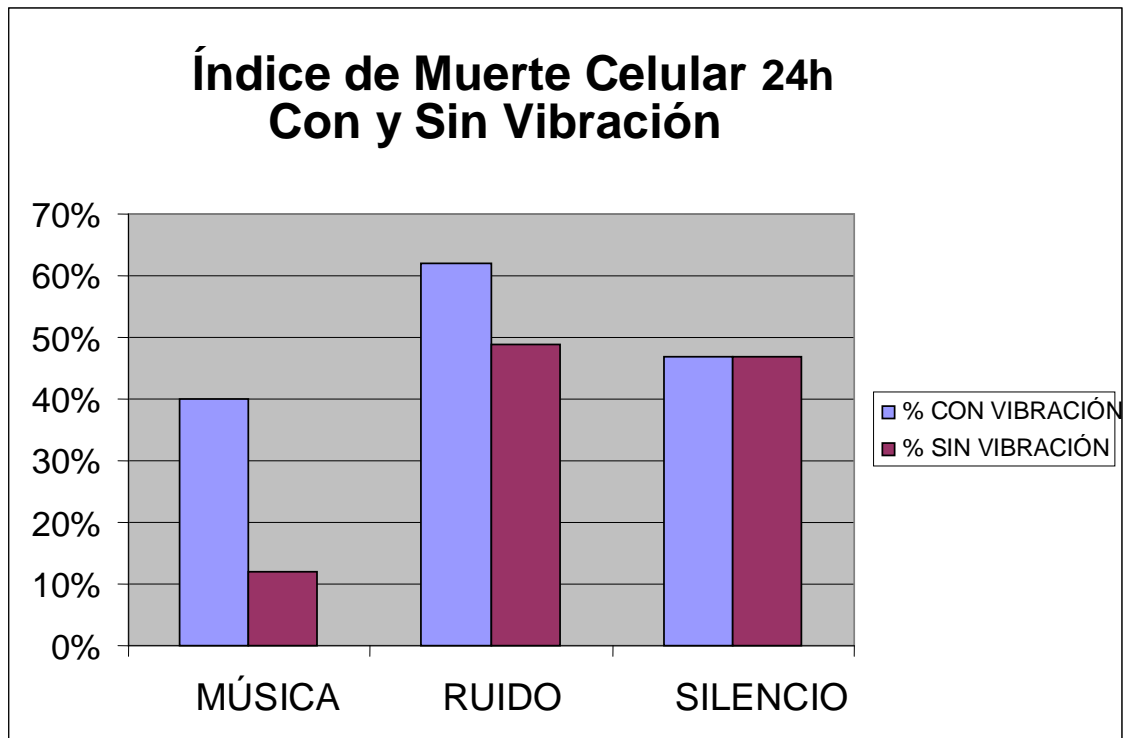


Gráfico 19. Índice de muerte celular tras exposición a música, ruido o silencio con y sin vibración

| T-Student |
|---|
| Música con vibración versus sin vibración $p= 0'043$ ($p<0'05$) significativo |
| Ruido con vibración versus sin vibración $p= 0'033$ ($p<0'05$) significativo |
| Silencio con vibración versus sin vibración $p= 0'737$ ($p>0'05$) NS |

Tabla 12. T-Student de las diferencias en el índice de muerte celular en condiciones de música, ruido o silencio con y sin vibración: muestra diferencias significativas entre ruido con y sin vibración y música con y sin vibración

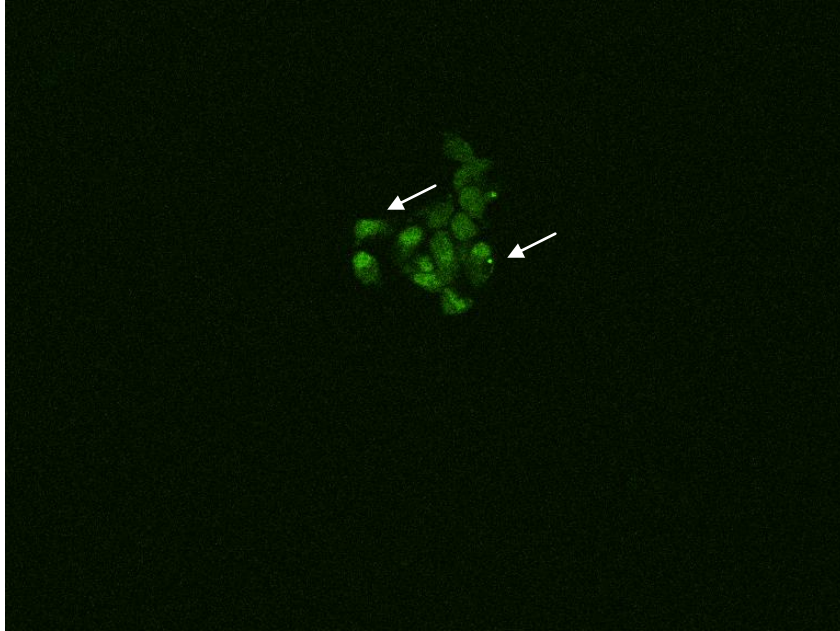


Fig. 35. Con Vibración T.U.N.E.L. Música

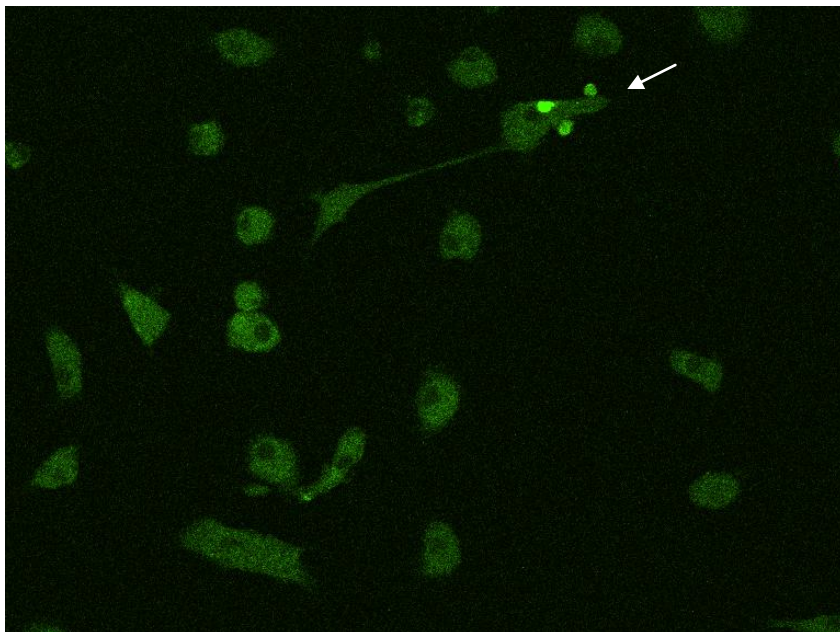


Fig. 36. Sin Vibración T.U.N.E.L. Música

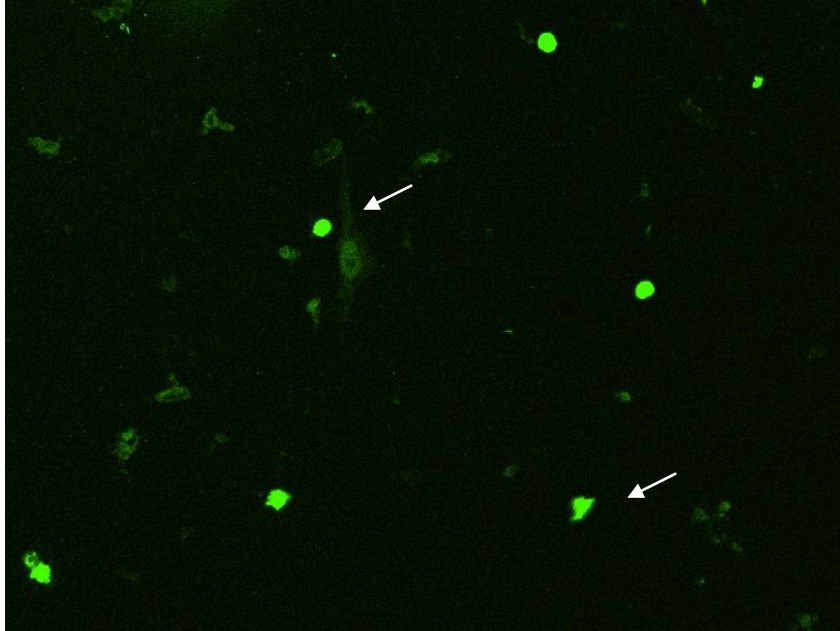


Fig. 37. Con Vibración T.U.N.E.L. Ruido

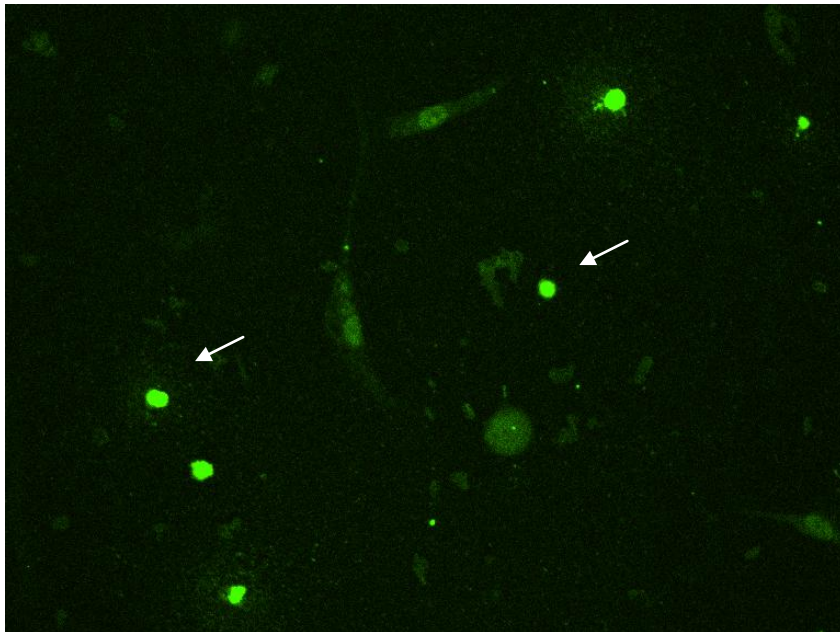


Fig. 38. Sin Vibración T.U.N.E.L. Ruido

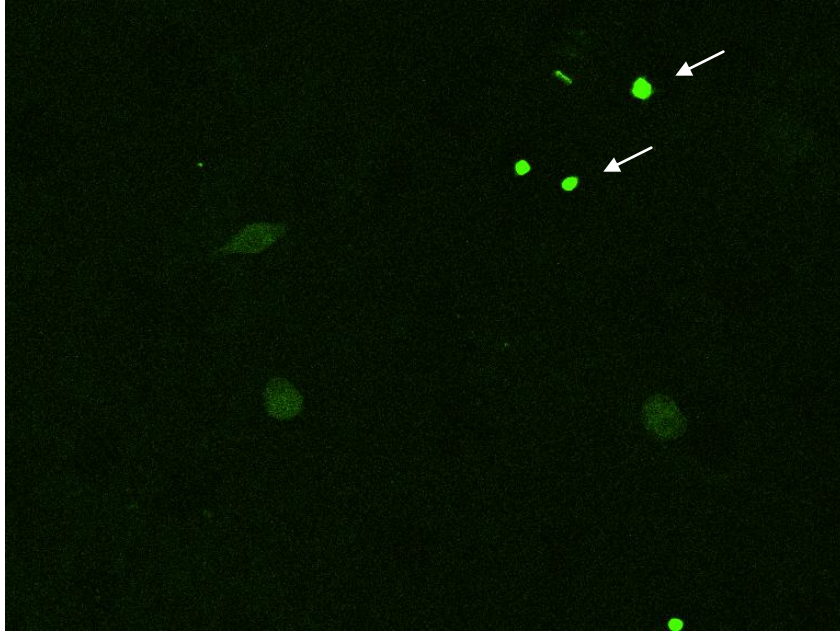


Fig. 39. Con Vibración T.U.N.E.L. Silencio

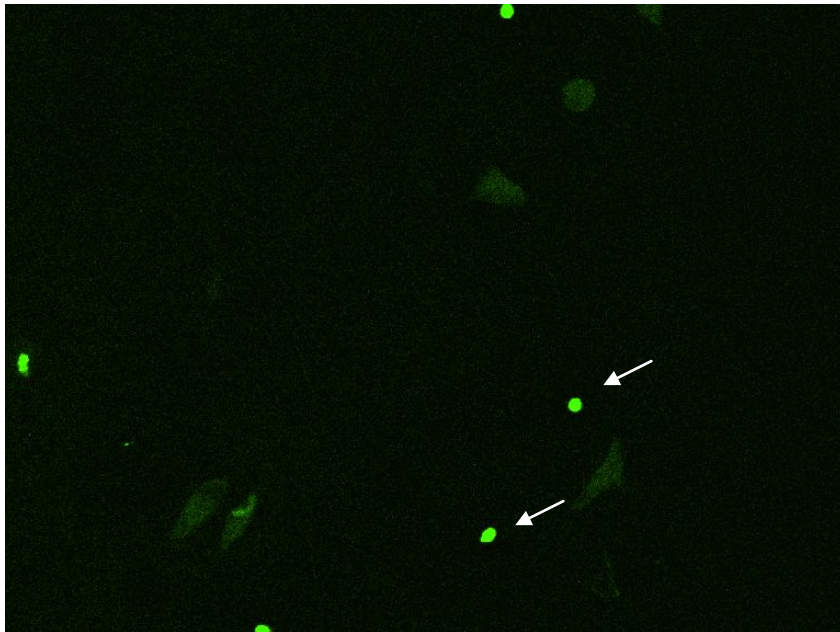


Fig. 40. Sin Vibración T.U.N.E.L. Silencio

2.2) Replicación celular con y sin vibración

El estudio del índice de replicación celular por incorporación de BrdU en las células cultivadas (ver Fig. 25 a 30) demuestra que, en la condición de música, se aprecia una ligera caída en el número de células BrdU positivas al eliminar la vibración, aunque la significatividad no es muy marcada (ver Tabla 8).

En el caso de la condición de ruido, se aprecia una diferencia significativa con y sin vibración de forma que al eliminar la vibración se reduce la caída de la replicación celular que se daba con vibración.

Por otro lado, al igual que sucedía con la muerte celular, no existen diferencias en la condición de silencio con y sin vibración (ver Gráfico 8).

La variabilidad de los datos aquí presentados no nos permite hacer una valoración taxativa de la influencia que la vibración añadida de la cámara de cultivo está ejerciendo sobre la replicación celular. Sin embargo, dada la contradicción entre los resultados en las condiciones de ruido y música, la impresión general es la de que no existe una influencia valorable sobre el proceso de replicación celular en función de dicha vibración en la cámara de cultivo.

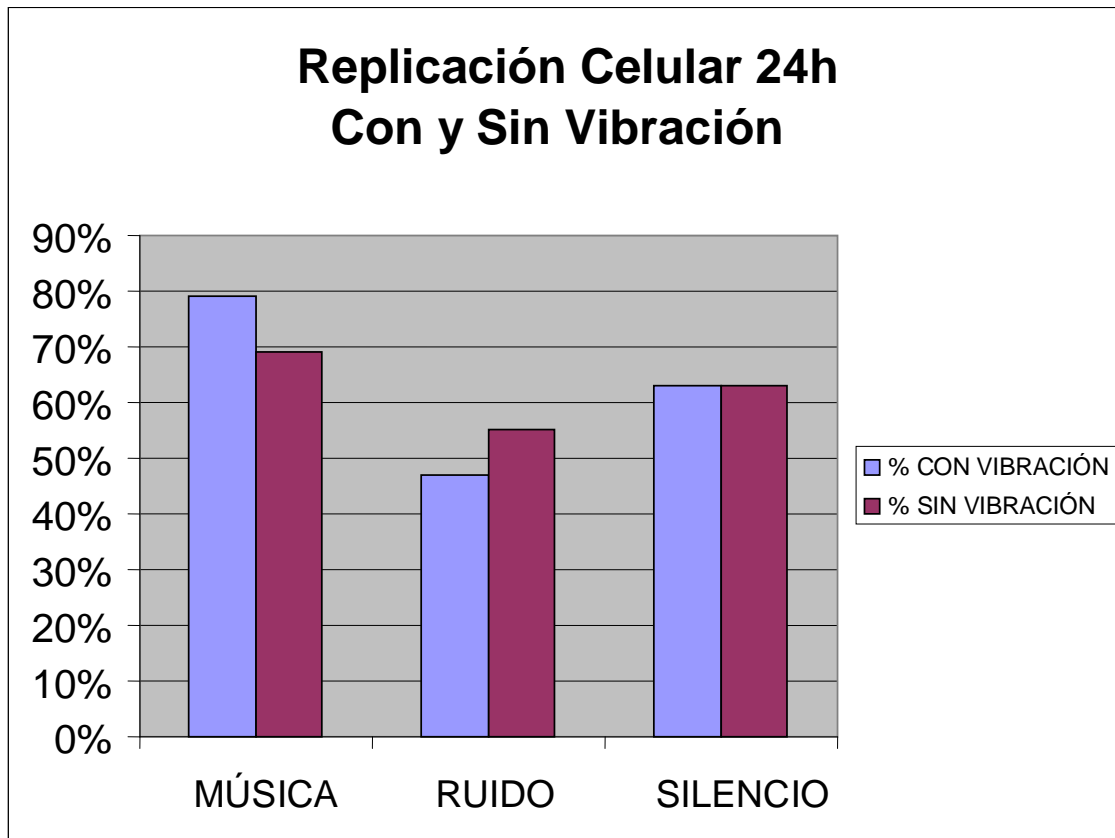


Gráfico 20. Índice de replicación celular tras exposición a música, ruido o silencio con y sin vibración

| T-Student |
|---|
| Música con vibración versus sin vibración $p= 0'011$ ($p<0'05$) significativo |
| Ruido con vibración versus sin vibración $p= 0'001$ ($p<0'05$) significativo |
| Silencio con vibración versus sin vibración $p= 0'572$ ($p>0'05$) NS |

Tabla 13. T-Student de las diferencias en el índice de replicación celular en condiciones de música, ruido o silencio con y sin vibración: muestra diferencias significativas entre ruido con y sin vibración y música con y sin vibración

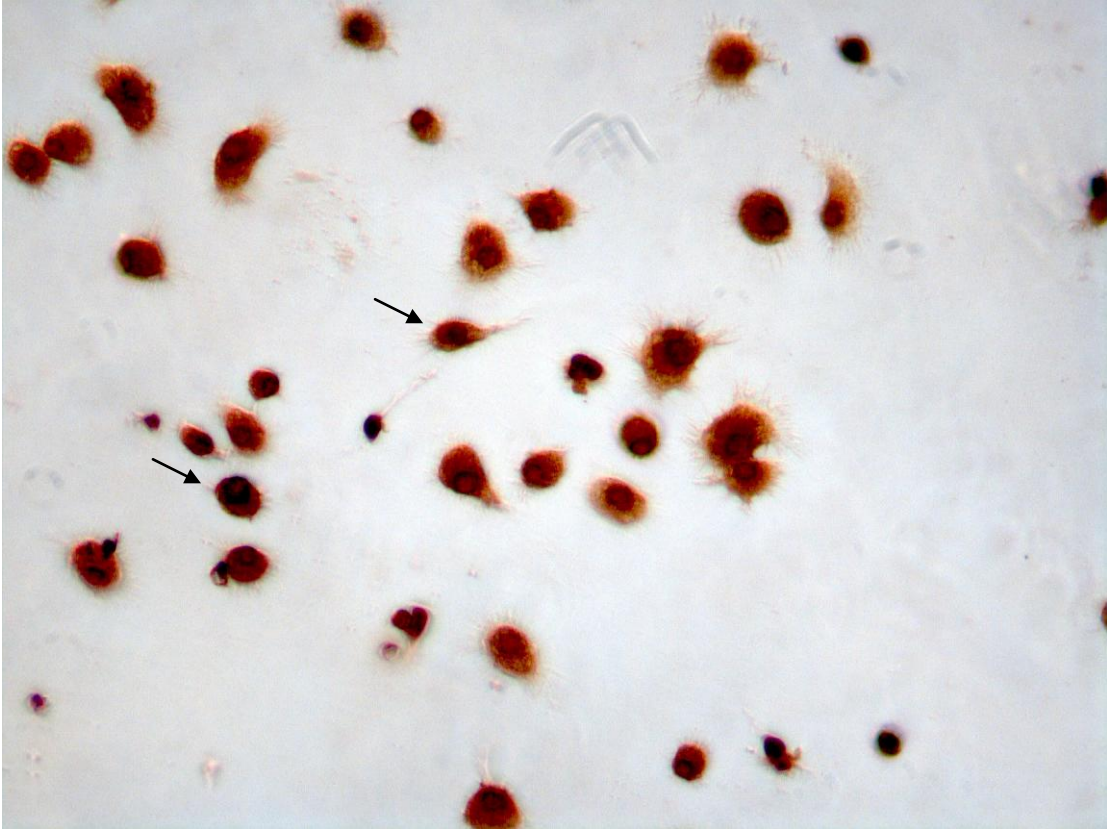


Fig. 41. Con Vibración BrdU Música

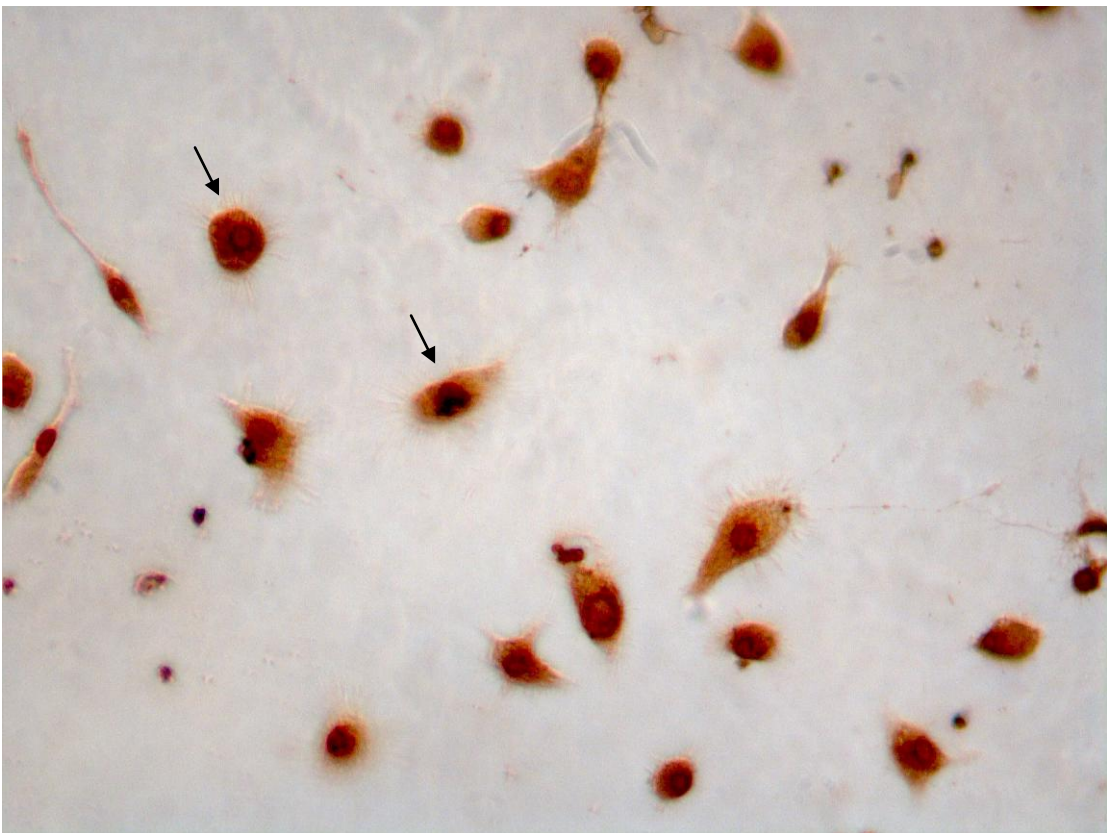


Fig. 42. Sin Vibración BrdU Música

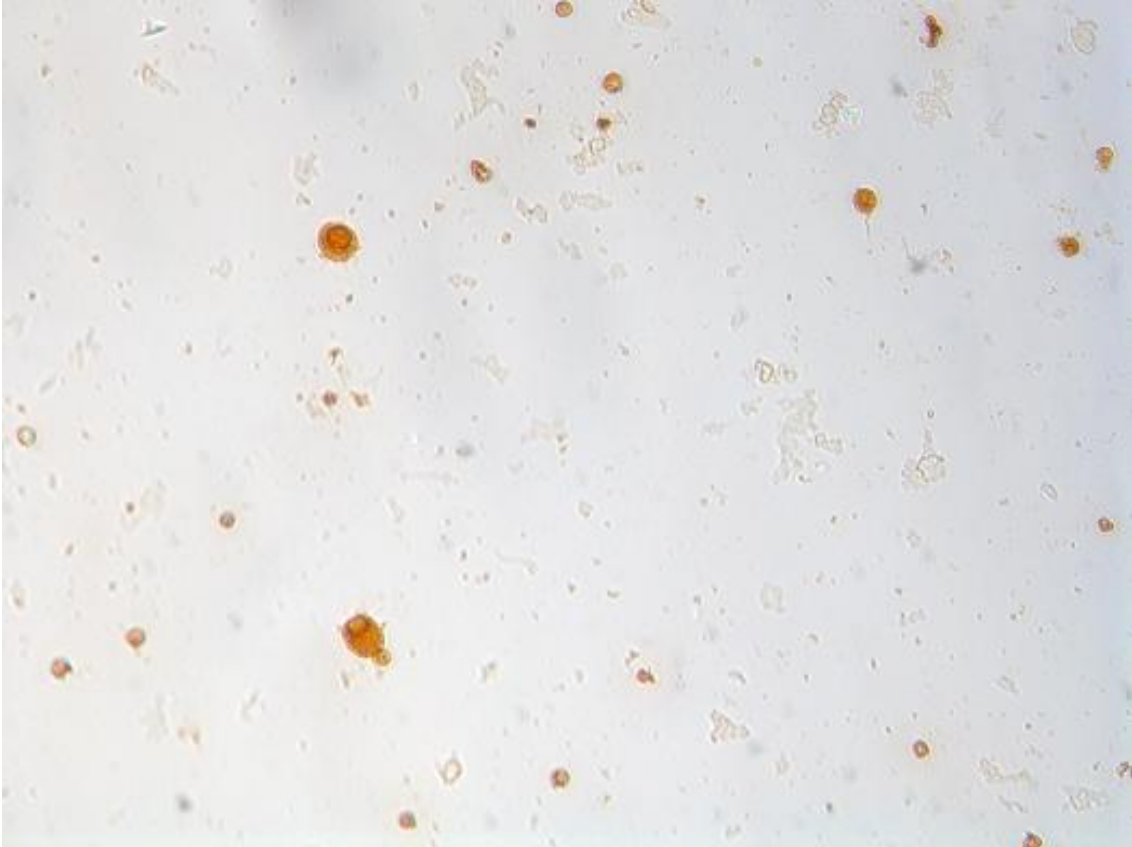


Fig. 43. Con Vibración BrdU Ruido

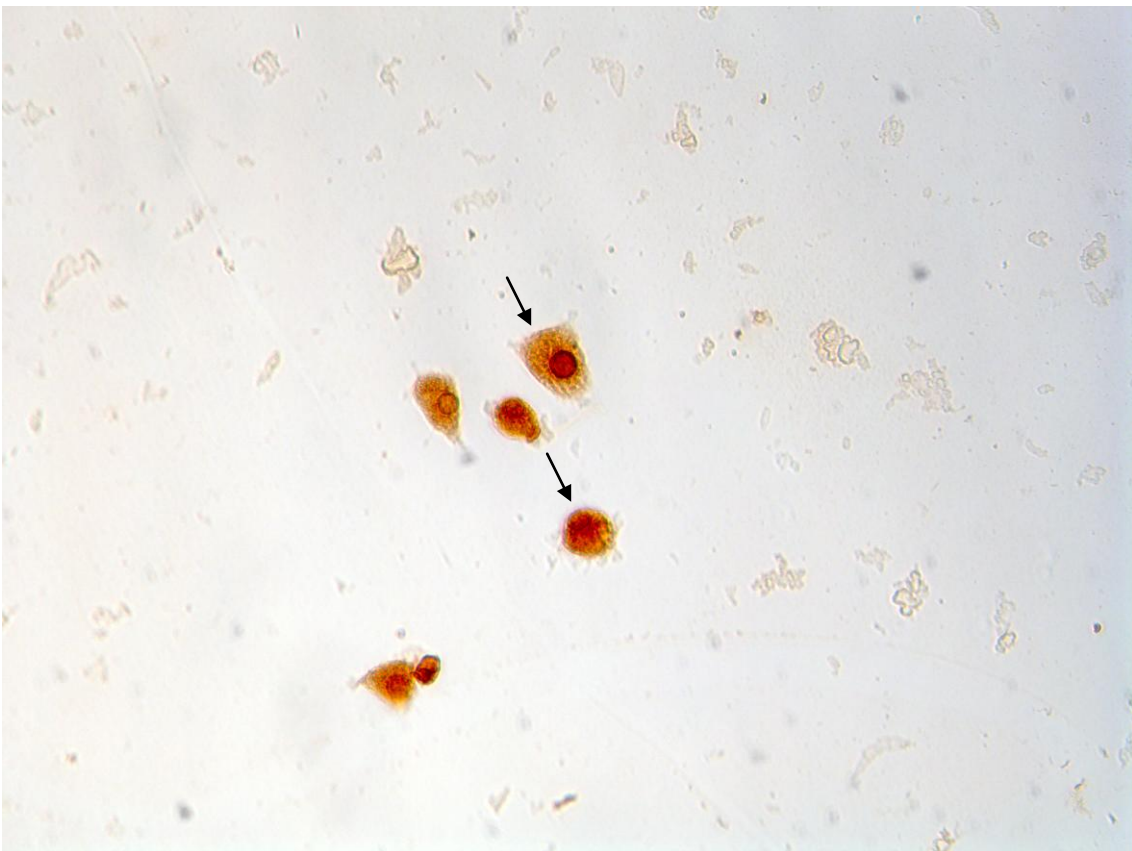


Fig. 44. Sin Vibración BrdU Ruido



Fig. 45. Con Vibración BrdU Silencio

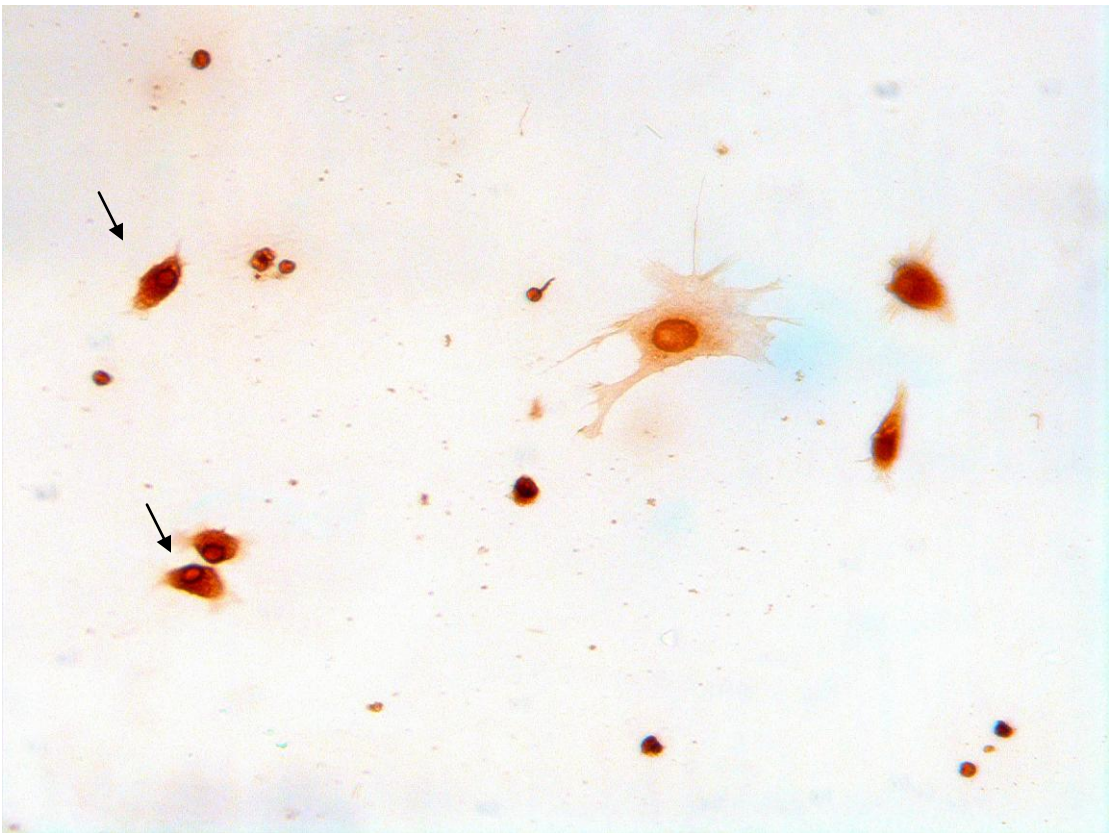


Fig. 46. Sin Vibración BrdU Silencio

2.3) Neurogénesis con y sin vibración

Por último, el estudio de la diferenciación neuronal con β -III-Tubulina (ver Fig. 31 a 36) indica que en ninguna de las tres condiciones experimentales existe una diferencia significativa entre el cultivo con y sin vibración (ver Gráfico 9). Como conclusión general podemos deducir que, mientras que la vibración de la cámara de cultivo sí parece afectar al mecanismo de supervivencia celular, no apreciamos una clara influencia sobre los otros dos mecanismos celulares valorados, replicación y neurogénesis, a los que podríamos considerar como mecanismos celulares activos. Esto avala los resultados comentados en capítulos anteriores.

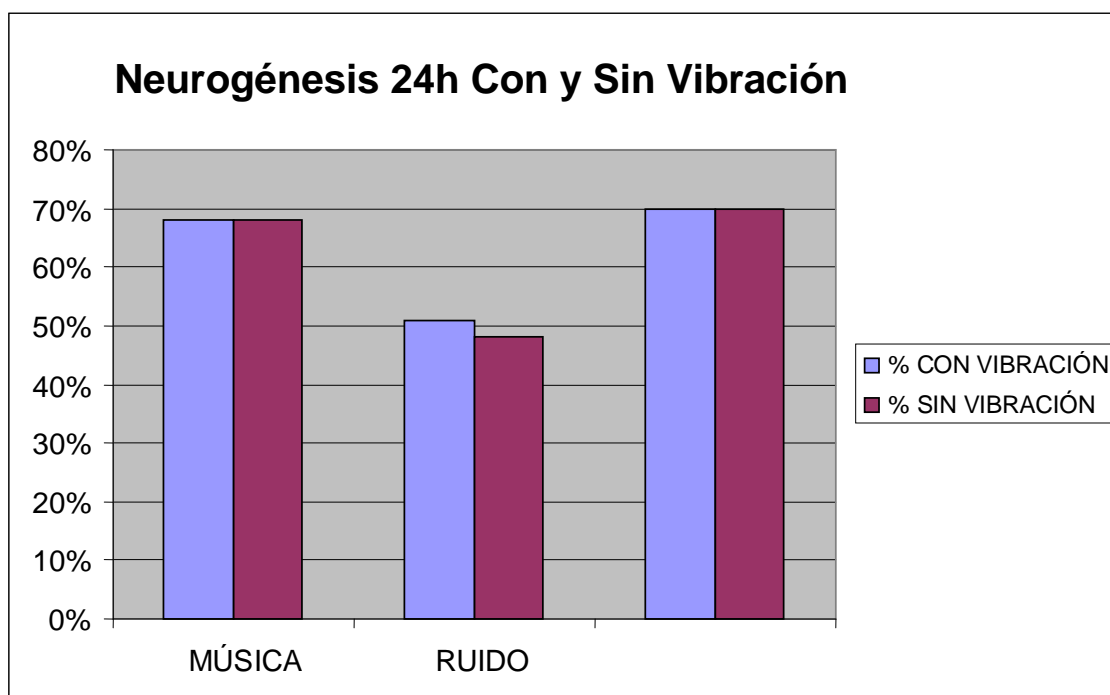


Gráfico 21. Índice de neurogénesis celular tras exposición a música, ruido o silencio con y sin vibración

| T-Student |
|--|
| Música con vibración versus sin vibración $p= 0'463$ ($p>0'05$) NS |
| Ruido con vibración versus sin vibración $p= 0'989$ ($p>0'05$) NS |
| Silencio con vibración versus sin vibración $p= 1$ ($p>0'05$)NS |

Tabla 14. T-Student de las diferencias en el índice de neurogénesis celular en condiciones de música, ruido o silencio con y sin vibración: no muestra diferencias significativas entre ninguna de las condiciones experimentales

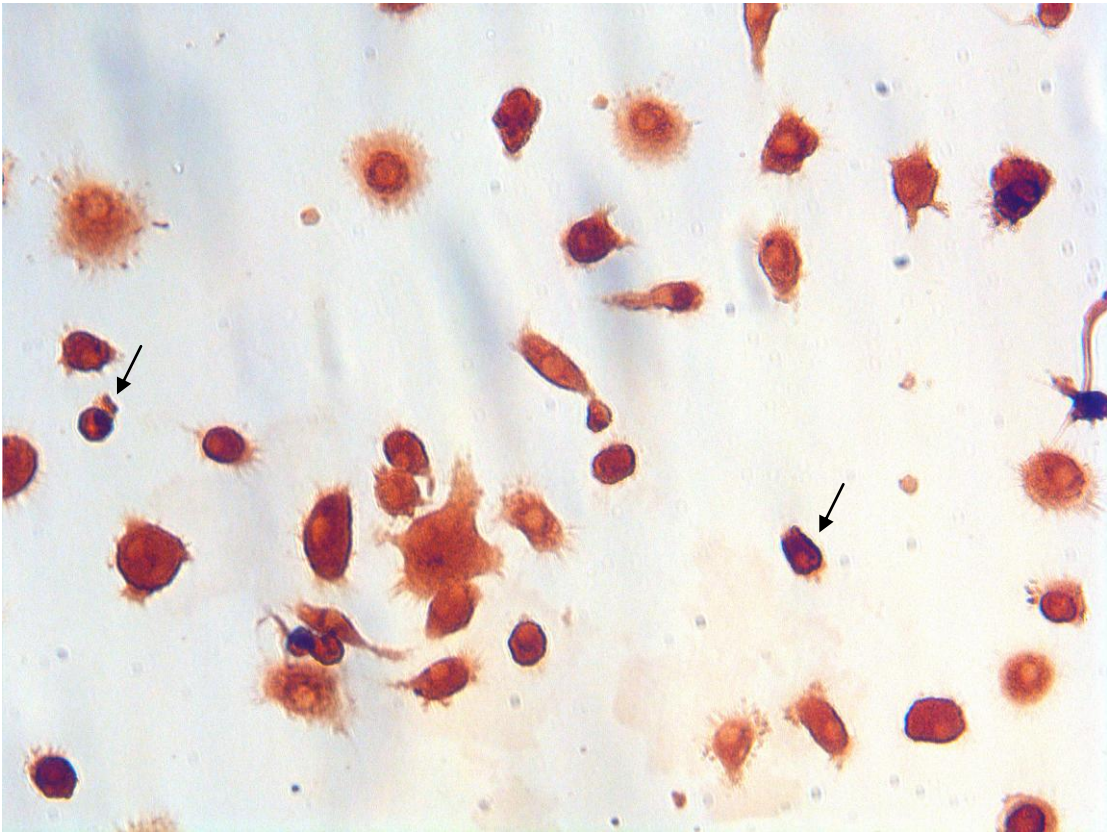


Fig. 47. Con Vibración β -III-Tubulina Música

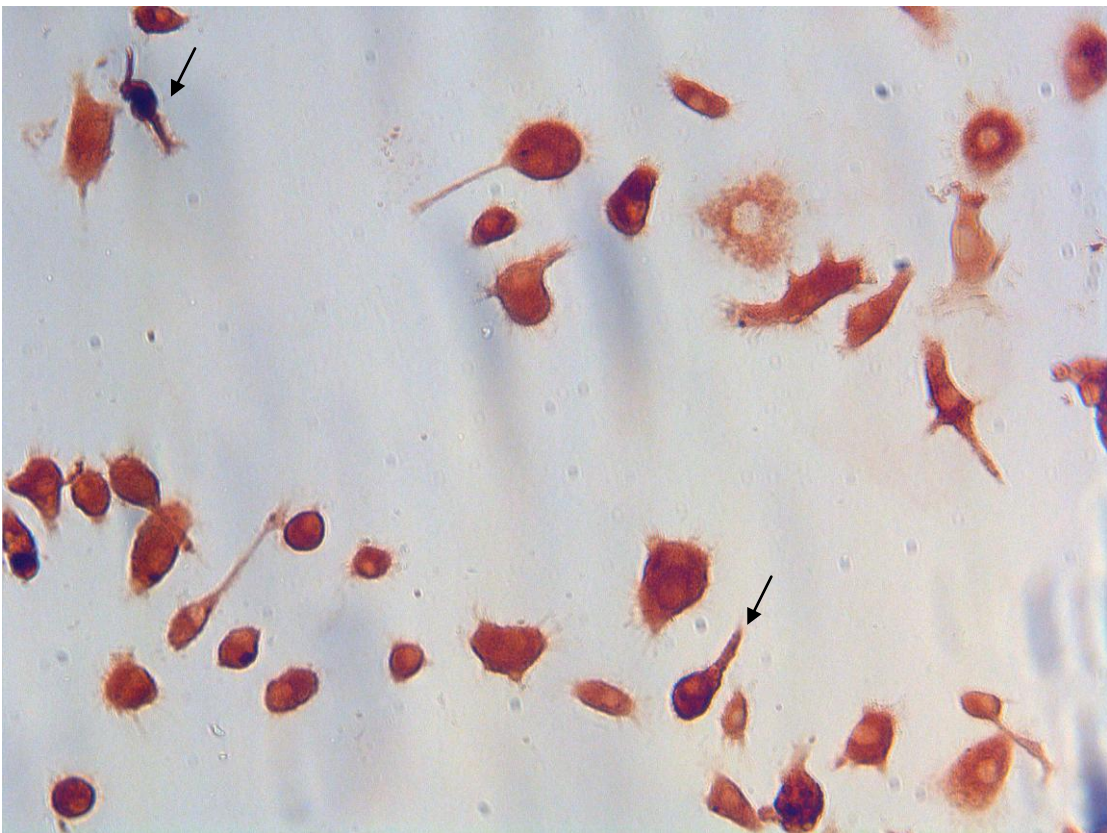


Fig. 48. Sin Vibración β -III-Tubulina Música

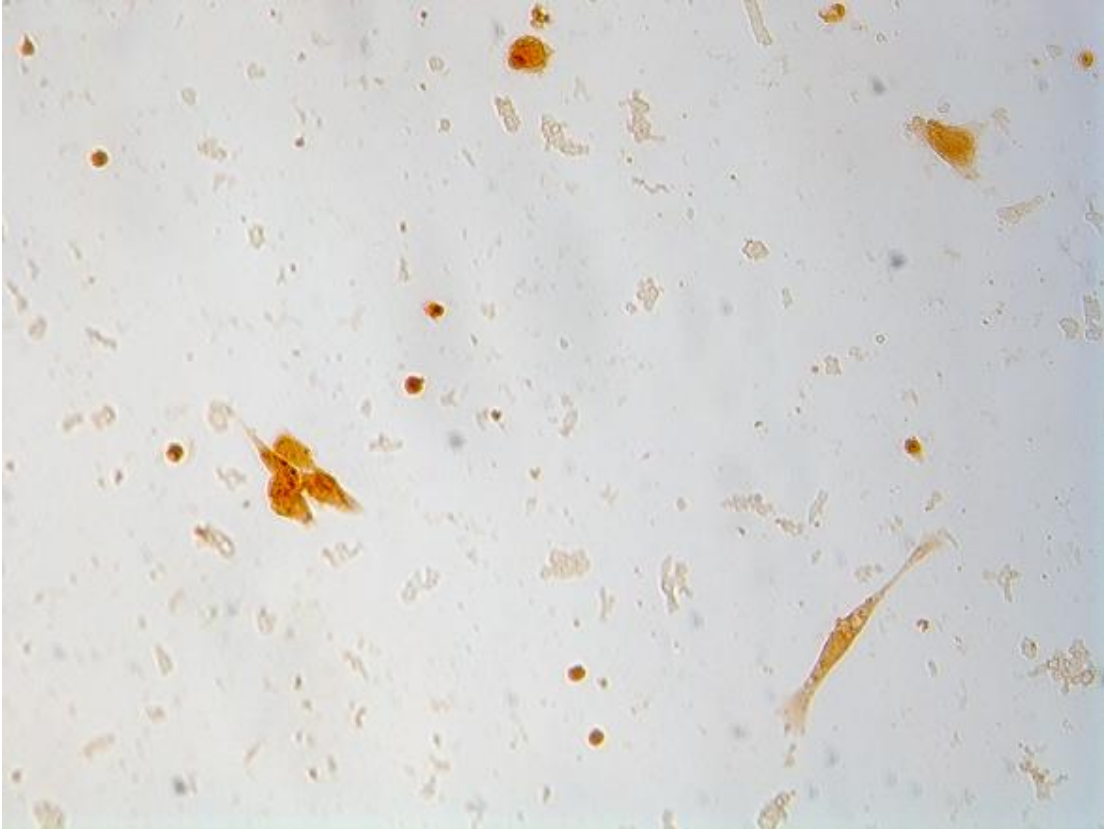


Fig. 49. Con Vibración β -III-Tubulina Ruido

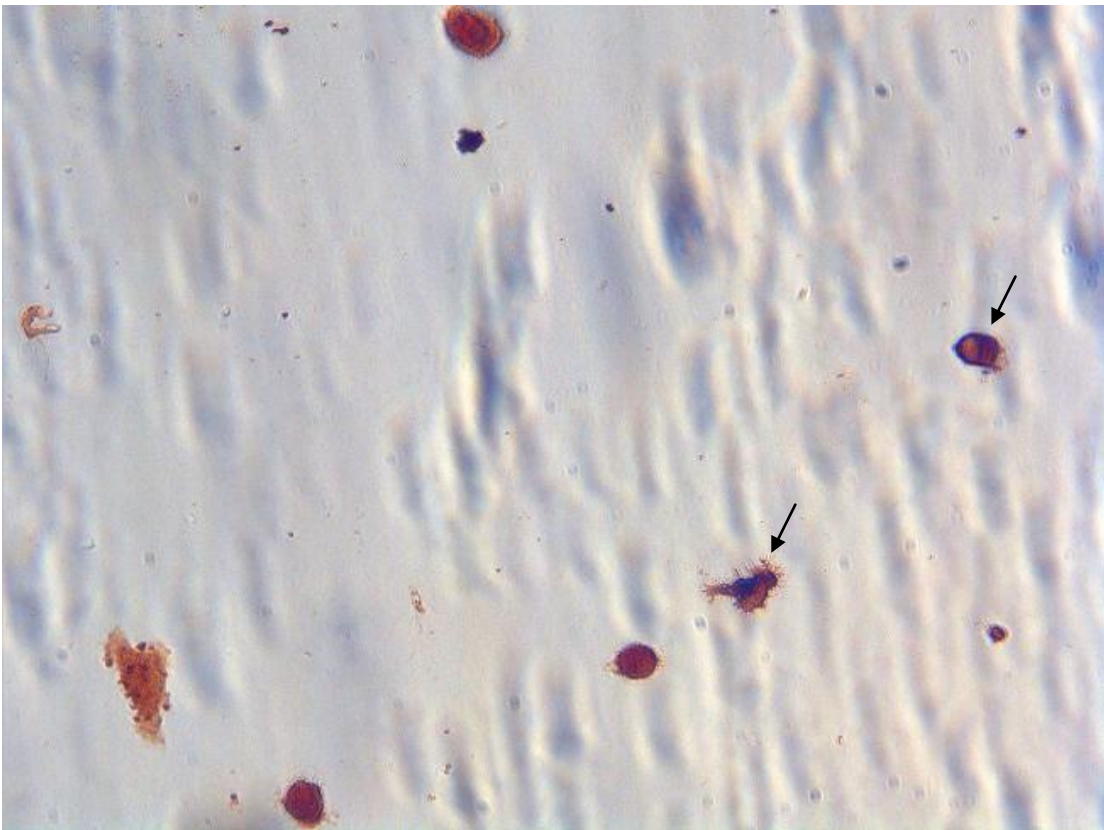


Fig. 50. Sin Vibración β -III-Tubulina Ruido

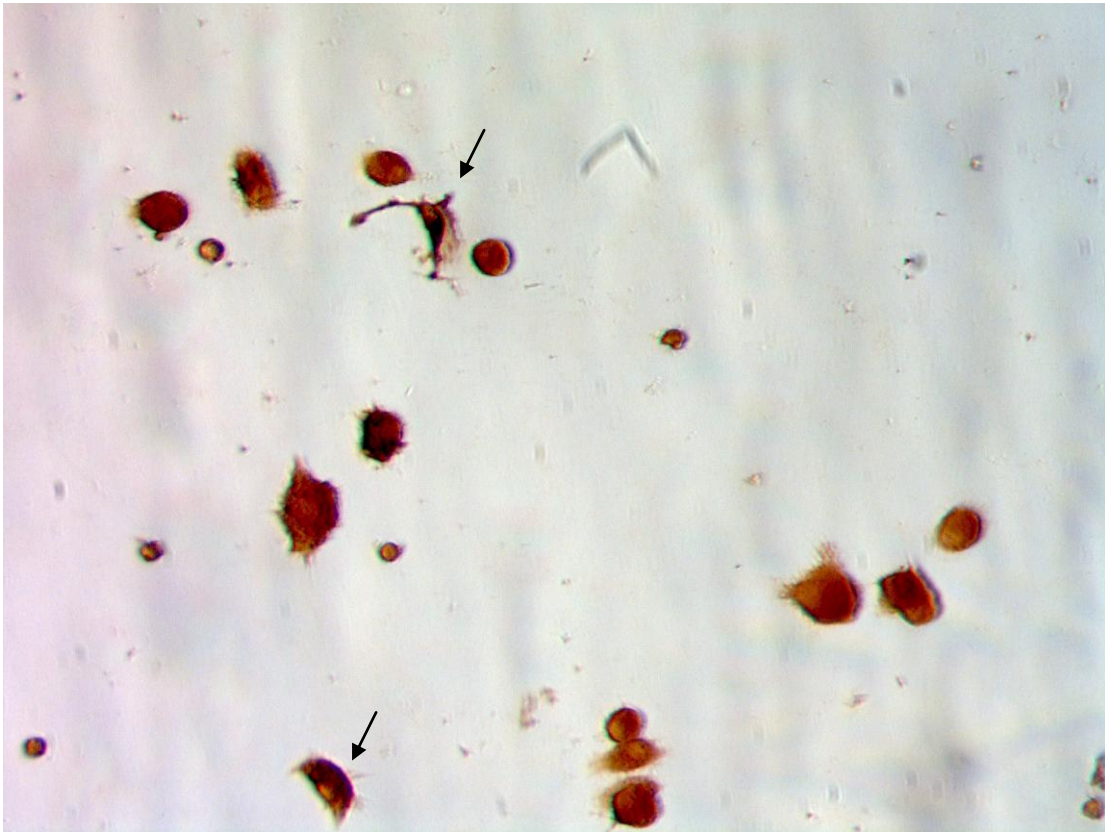


Fig. 51. Con Vibración β -III-Tubulina Silencio

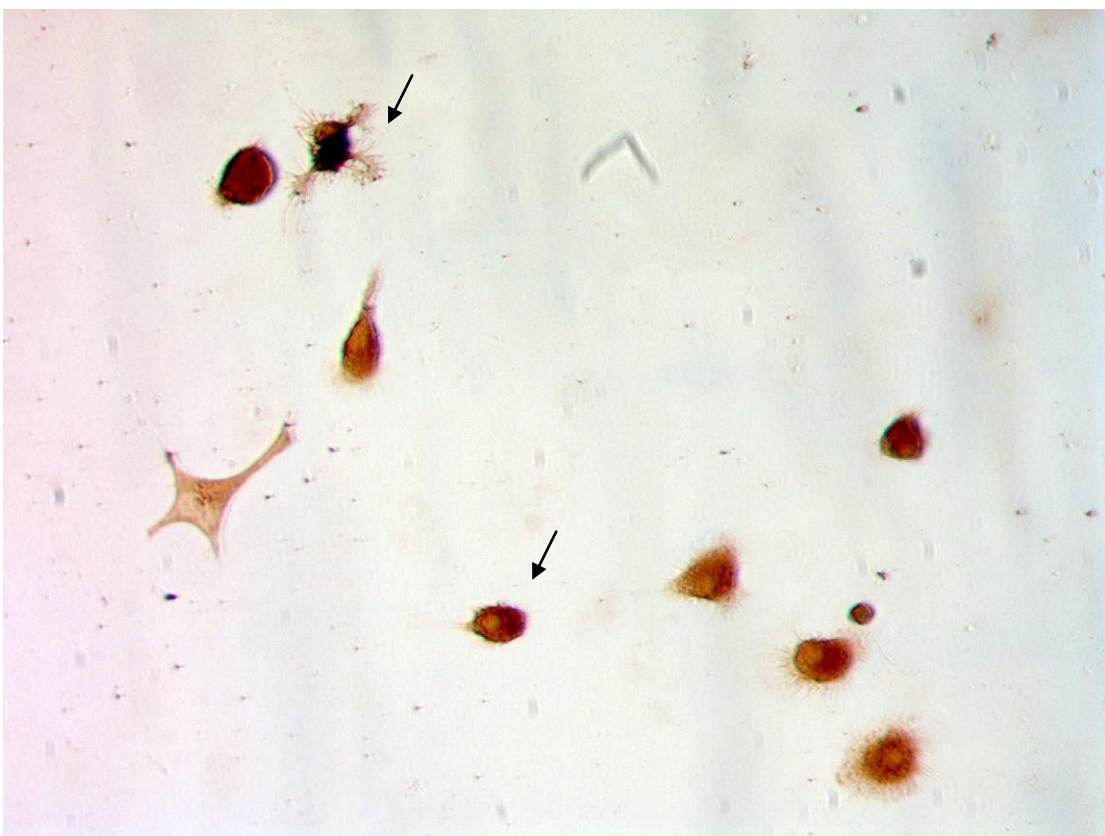


Fig. 52. Sin Vibración β -III-Tubulina Silencio

3. VALORACIÓN DE COMPONENTES BÁSICOS DE LA MÚSICA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CELULAR

Dado que el estímulo musical elegido para nuestro estudio es una sinfonía musical compleja en la que intervienen los distintos componentes de la música, nos hemos planteado como complemento de nuestro estudio valorar si los efectos que la música tiene sobre el comportamiento de las células epiteliales del cultivo in Vitro son una propiedad inherente a la música en su conjunto, o bien si pueden deberse a alguno de sus componentes en particular. Debido a la complejidad de este estudio y las múltiples variables posibles decidimos elegir el elemento más simple de la música, como es el pulso.

Como ya hemos comentado en el apartado de material y métodos, hemos empleado el pulso reproduciéndolo de dos maneras diferentes, como golpe (al que hemos denominado “pulso”) y como nota (“pulso nota”).

3.1) Índice de muerte celular (T.U.N.E.L.) con pulso, pulso nota o silencio

El Gráfico 10 muestra como el porcentaje de células apoptóticas en cultivo es similar en la condición de Pulso Nota y Silencio, aunque se detecta una llamativa disminución en el número de células al exponer al cultivo a la condición de Pulso, diferencia que es estadísticamente significativa con respecto a los otros dos parámetros (ver Tabla 10 y Fig. 37). De estos datos se desprende que el efecto potenciador de la supervivencia celular que hemos detectado en los experimentos previos por parte de la música podría radicar en alguno de sus componentes básicos como es el pulso. Curiosamente podría ser debido al pulso generado de la forma “más simple”, con un golpe.

Sin embargo, dos hechos permanecen si aclarar:

Uno de ellos es que el efecto activador de la supervivencia celular generado por el pulso se manifiesta en el periodo de 24 horas, lo que no ocurría con la exposición a música.

Por otra parte sólo obtenemos dicho efecto con el pulso-golpe y no con el pulso-nota, en el que influyen otras cualidades del sonido (timbre y altura).

De estos datos podemos inferir que el efecto de la música sobre la supervivencia celular puede radicar en algún componente de la música individualizado, y que este componente podría deberse a uno de sus elementos más simples, como es el pulso.

Esto apoya nuestra hipótesis inicial de que la música puede ejercer un efecto sobre los seres vivos actuando como un agente físico. No obstante, estas últimas observaciones necesitan de estudios más profundos para ser consideradas como conclusiones definitivas.

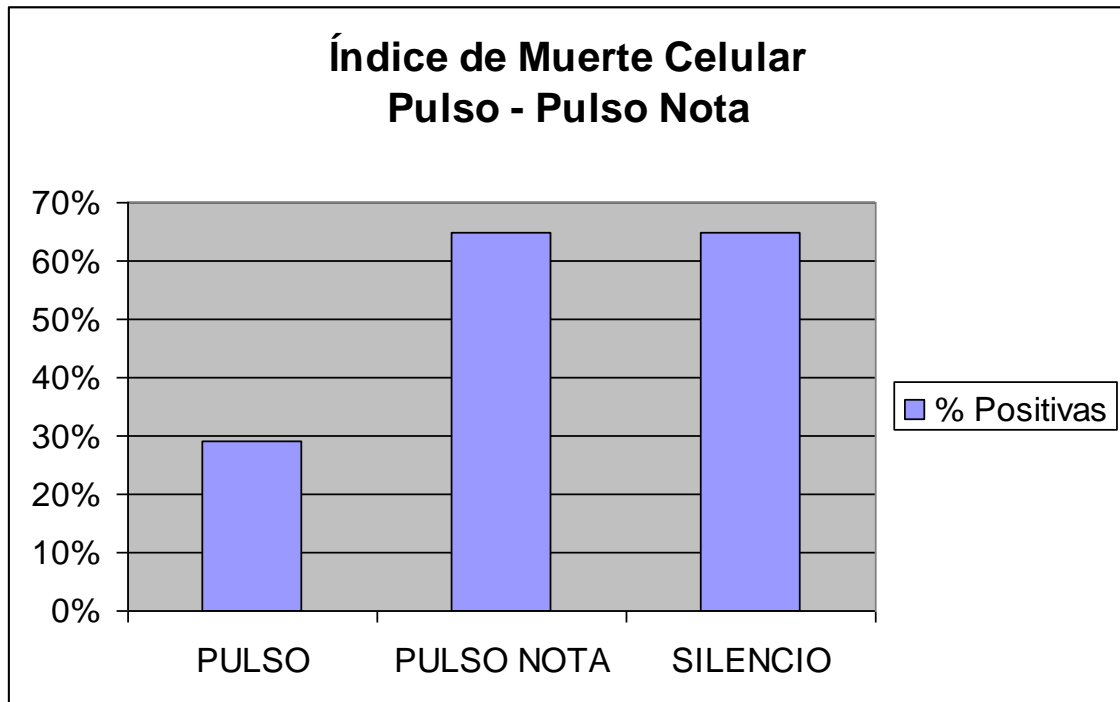
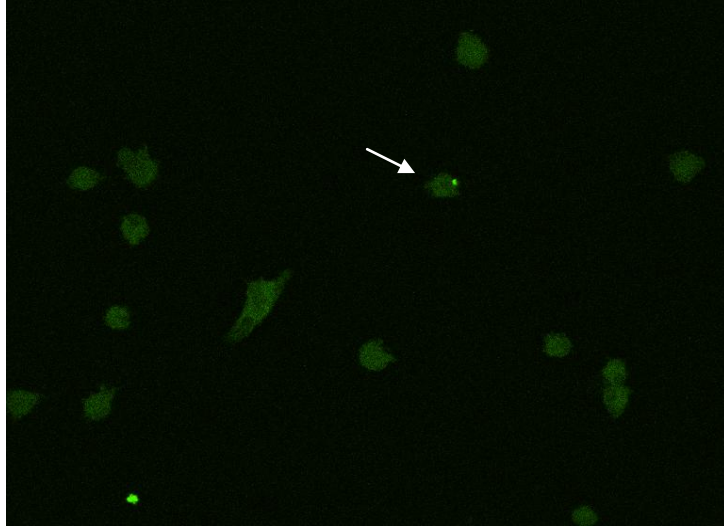


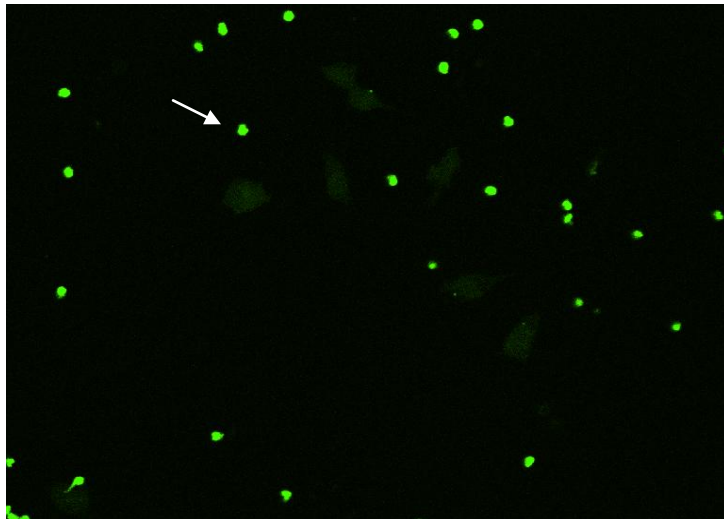
Gráfico 22. Índice de muerte celular tras exposición a pulso, pulso-nota y silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|------------------|-------------|--------|------------|
| No. of subjects: | 46 | | | | |
| No. of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 10 | | | |
| 2 | Pulso | 20 | | | |
| 3 | Pulso Nota | 16 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 0,0006 | <-- significant! | | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | Pulso | Pulso Nota | significant | 0,0002 | 0,0167 |
| 2 | silencio | Pulso | significant | 0,0028 | 0,025 |
| 3 | silencio | Pulso Nota | NS | 0,6947 | 0,05 |

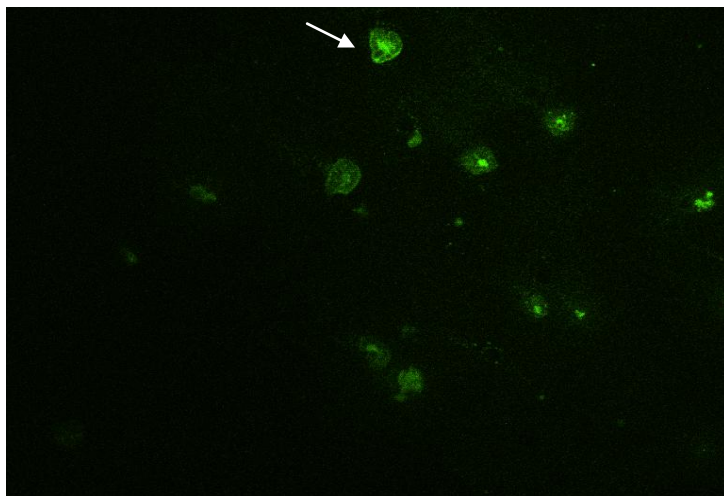
Tabla 15. Anova de las diferencias en el índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a pulso, pulso nota o silencio: $p < 0'05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra diferencias significativas entre las condiciones experimentales: pulso-pulso nota y silencio-pulso



T.U.N.E.L. Pulso



T.U.N.E.L. Pulso Nota



T.U.N.E.L. Silencio

Fig. 53. TUNEL con Pulso, Pulso Nota y Silencio

3.2) Replicación celular con pulso, pulso nota o silencio

Respecto a la influencia que ejerce la música sobre aspectos activos del comportamiento celular como es la replicación celular (ver Fig. 38.), el mismo abordaje experimental que en el caso anterior demuestra que tanto el pulso como el pulso nota no ejercen variaciones significativas (ver Gráfico 11 y Tabla 11) en cuanto al comportamiento replicativo de estas células, que se mantiene a nivel basal (similar al del silencio). Dado que, como hemos demostrado previamente, la música sí que activa la replicación celular a las 24 horas de cultivo, podemos concluir que dicho efecto activador no se debería a su componente básico, pulso.

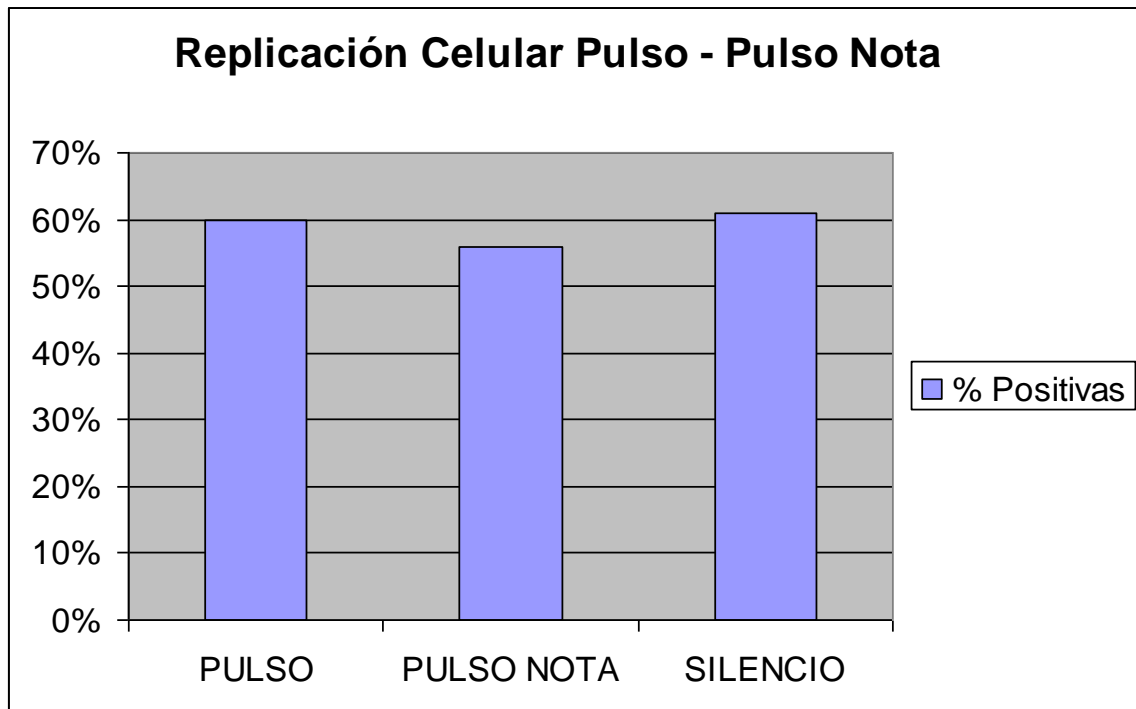
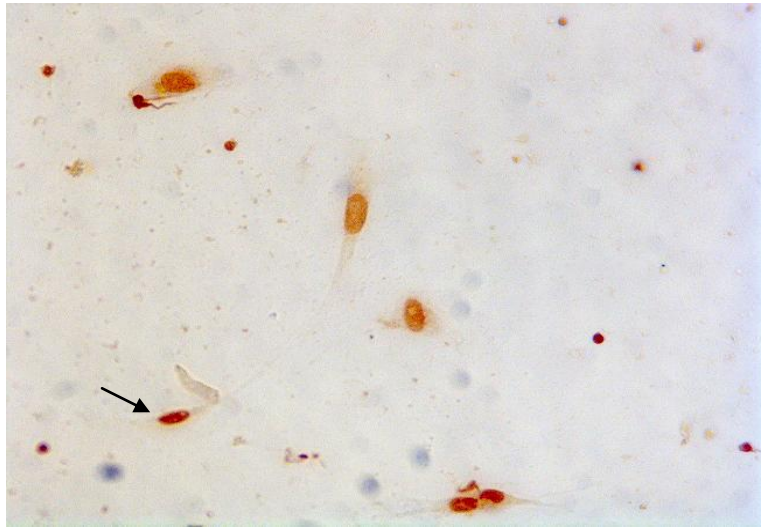


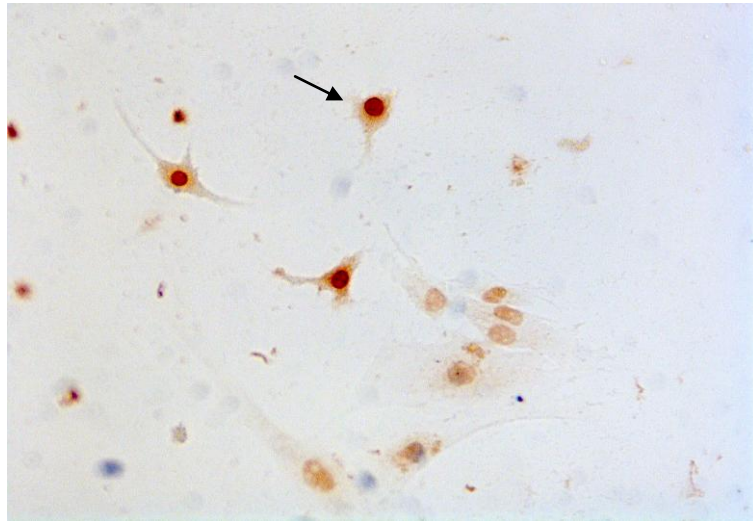
Gráfico 23. Índice de replicación celular tras exposición a pulso, pulso-nota y silencio

| ANOVA RESULTS | | |
|------------------|-----------------------|----------|
| No. of subjects: | 134 | |
| No. of groups: | 3 | |
| | Group | N |
| 1 | silencio | 24 |
| 2 | pulso | 49 |
| 3 | pulso nota | 61 |
| df between | 2 | |
| P = | 0,7273 ($p > 0'05$) | NS |

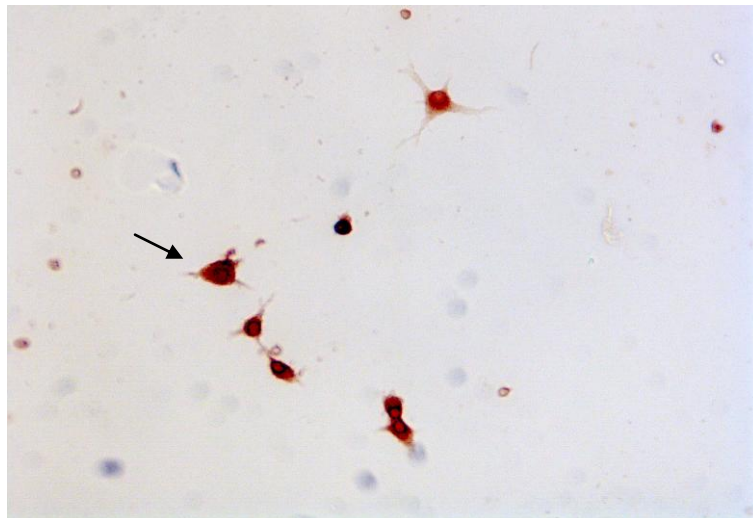
Tabla 16. Anova de las diferencias en el índice de muerte celular tras 24 horas de exposición a pulso, pulso nota o silencio: $p > 0'05$



BrdU Pulso



BrdU Pulso Nota



BrdU Silencio

Fig. 38. BrdU con Pulso, Pulso Nota y Silencio

3.3) Neurogénesis con pulso, pulso nota o silencio

Por último, el mismo diseño experimental valorado mediante la expresión de β -III-Tubulina (ver Fig. 39.) revela datos significativos (ver Gráfico 12 y Tabla 12).

En primer lugar, ambas condiciones de pulso generan un número significativamente mayor de células β -III-Tubulina positivas con respecto a la condición de silencio. Éste incremento es particularmente evidente en la condición de pulso-nota.

Estos datos sugieren que el componente esencial de la música e inherente a ella como es el pulso, además de contribuir a la supervivencia celular, parece estar relacionado significativamente con la activación de la neurogénesis.

Estos datos vienen a apoyar también la interpretación de que los efectos de la música sobre el comportamiento de los seres vivos dependen de factores básicos de la estructura musical, sugiriendo que puede tratarse de un fenómeno físico basado en las ondas sonoras.

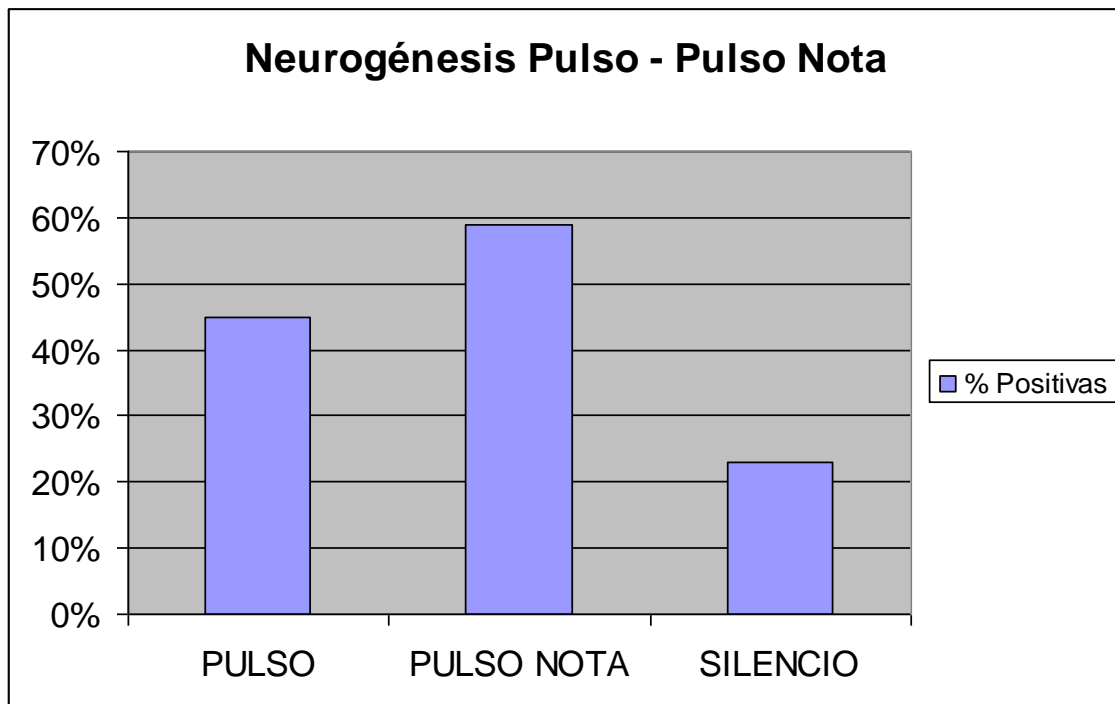
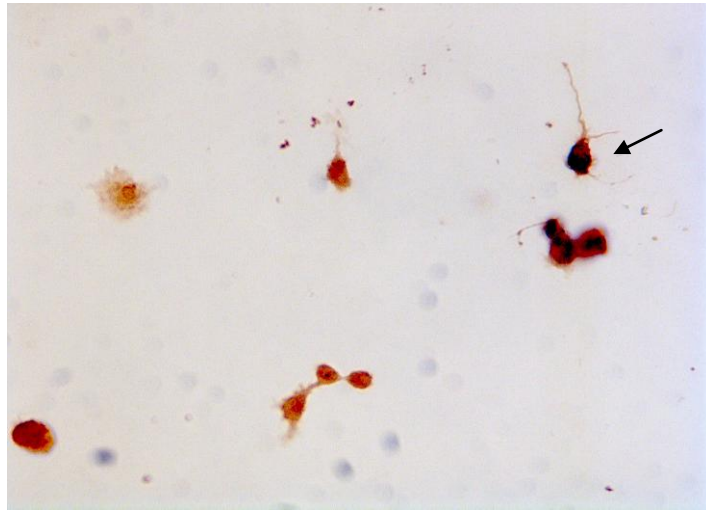


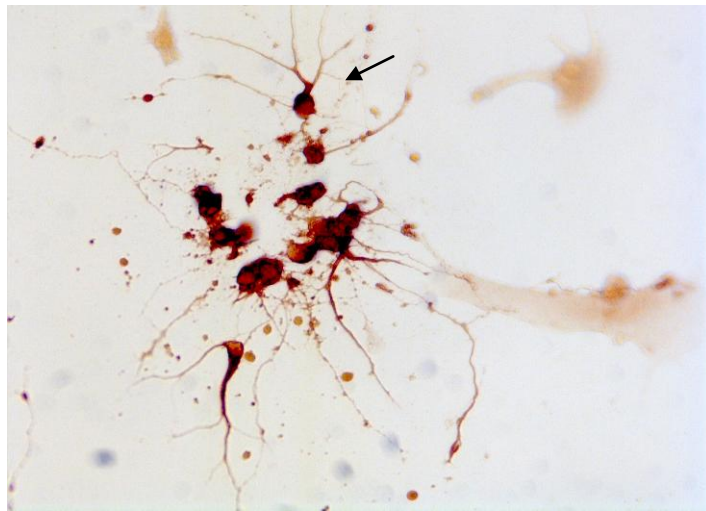
Gráfico 24. Índice de neurogénesis celular tras exposición a pulso, pulso-nota y silencio

| ANOVA RESULTS | | | | | |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------|----------|------------|
| No. of subjects: | 115 | | | | |
| No. of groups: | 3 | | | | |
| | Group | N | | | |
| 1 | silencio | 22 | | | |
| 2 | pulso | 40 | | | |
| 3 | Pulso Nota | 53 | | | |
| df between | 2 | | | | |
| P = | 9,56E+07 | <-- significant | | | |
| Posthoc results | (Bonferroni-Holm) | | | | |
| | Group 1 | Group 2 | Result | P | Adj. Alpha |
| 1 | silencio | Pulso Nota | significant | 1,54E+08 | 0,0167 |
| 2 | silencio | pulso | significant | 0,001 | 0,025 |
| 3 | pulso | Pulso Nota | significant | 0,0066 | 0,05 |

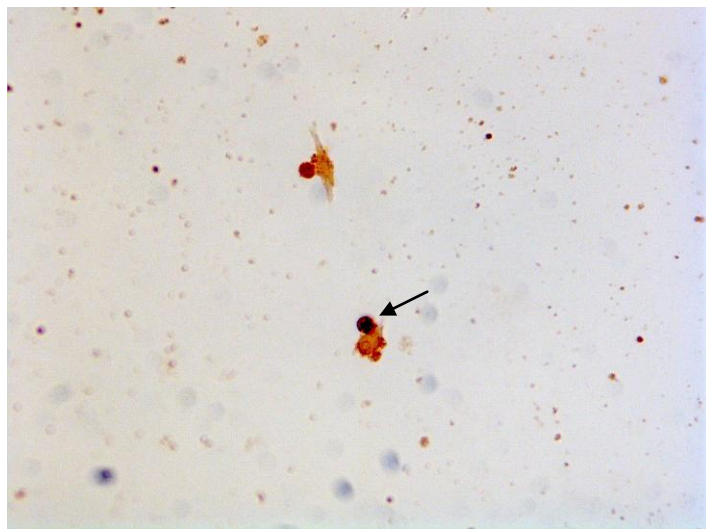
Tabla 17. Anova de las diferencias en el índice de neurogénesis celular tras 24 horas de exposición a pulso, pulso nota o silencio: $p < 0,05$ y posthoc "Bonferroni-Holm" que muestra diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales: silencio-pulso nota, silencio-pulso y pulso-pulso nota



β-III-Tubulina Pulso



β-III-Tubulina Pulso Nota



β-III-Tubulina Silencio

Fig. 55. β-III-Tubulina Con Pulso, Pulso Nota y Silencio

DISCUSIÓN

1. VALORACIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Los resultados aportados en la presente tesis doctoral demuestran que la música como agente físico, es decir como energía transmitida a través de ondas sonoras, es capaz de inducir modificaciones específicas en el comportamiento de precursores neuronales de cerebro de embriones de ratón, en el sentido de mejorar la supervivencia celular, activar su replicación y favorecer la diferenciación neuronal.

Una revisión extensa de la bibliografía, revela que existen numerosos estudios en los que se demuestra que las ondas sonoras de distinta procedencia (música, ruido, etc.) son capaces de inducir cambios específicos en el comportamiento de células de estirpe neuronal en distintos sistemas biológicos. Pero la mayoría de dichos estudios no demuestran la existencia de una influencia directa sobre el comportamiento celular, sino que ésta se realiza a través de sistemas de captación y transmisión auditivos con mediación de redes o circuitos neuronales.

En la presente tesis doctoral demostramos, mediante un diseño experimental apropiado, que existe dicha influencia directa de la música sobre el comportamiento de precursores neuronales. En base a estos criterios trataremos de interpretar y contrastar nuestros resultados con los de otros estudios, en función de si el efecto global de la música (sonido) sobre el comportamiento celular se ejerce de manera directa o indirecta.

2. INFLUENCIA DE LOS ESTÍMULOS SONOROS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE MECANISMOS INDIRECTOS

La mayor parte de los estudios que hemos encontrado hacen referencia a cambios inducidos en el comportamiento celular por ondas sonoras a través de mecanismos indirectos.

En este sentido destacan los trabajos del grupo de Wadhwa y colaboradores (Chaudhury *et al.* 2006, 2008, 2009 y Chaudhury & Whadwa 2009), que demuestran la capacidad de la música ó de determinados sonidos para inducir cambios específicos en el comportamiento de las neuronas del hipocampo.

Estos autores muestran que la aplicación de estímulos sonoros específicos de especie, o de música, durante el periodo de desarrollo fetal del pollo, es capaz de incrementar el flujo de calcio en las neuronas del hipocampo mejorando su capacidad de supervivencia. A pesar de que estos datos podrían servir de soporte a nuestros resultados como ejemplo de influencia del sonido en el comportamiento neuronal, existe una diferencia fundamental, como ya hemos comentado, entre este sistema experimental y el nuestro.

Mientras que en nuestro sistema la acción de las ondas sonoras generadas por la música se ejerce directamente sobre la célula, en los trabajos de Wadhwa y colaboradores se presupone que la mayor parte de la influencia es ejercida a través de la vía auditiva. Esto implica un mecanismo por el cual las ondas sonoras se trasforman en energía mecánica y posteriormente lo hacen en potenciales eléctricos que son transmitidos por medio de neurotransmisores, que posiblemente sean los responsables de la apertura de los canales de calcio. Todo ello supone que el efecto ejercido sobre el comportamiento de las neuronas del hipocampo puede ser atribuido a la excitación sináptica que reciben por parte de la vía auditiva.

Estos mismos autores (Wadhwa *et al.* 1999) describieron que la aplicación de un sonido a fetos de pollo induce cambios en el núcleo auditivo, que tiene un mayor número de células gliales y neuronales, siendo éstas de mayor tamaño que en los controles. Posteriormente Alladi *et al.* en 2002, con el mismo diseño experimental, describen un incremento significativo de la inmunoreactividad a la sinaptofisina y syntaxina en los núcleos magnocelular y laminar en fetos de pollo.

En esta línea, otros estudios han demostrado que la exposición de fetos de distintas especies a un estímulo sonoro genera cambios específicos en el comportamiento de las células del sistema nervioso central. Alladi *et al.* 2005 demuestran que la exposición a música o ruido mejora la supervivencia celular de neuronas del núcleo auditivo en fetos de pollo por incremento de la proteína anti apoptótica Bcl-2, sin embargo sólo la música es capaz de generar un incremento en el número y volumen de neuronas de este núcleo.

Igualmente Chaudhury *et al.* en 2006 y Chaudhury *et al.* en 2008, siguiendo la misma aproximación experimental, detectan un incremento en el volumen de neuronas del hipocampo que atribuyen a la capacidad del estímulo musical para aumentar los niveles de calbindina y parvalbúmina que, por su capacidad para ligar calcio, relacionan con un incremento en el flujo intracelular de este ión. Estos trabajos, al igual que los anteriores, implican una serie de elementos intermedios que no permiten atribuir una acción directa del sonido sobre el comportamiento celular.

Otra vía de influencia indirecta de la música sobre el comportamiento animal, en concreto sobre procesos de aprendizaje y memoria, es la descrita por Chikahisa *et al.* en 2006 a través de su influencia en los niveles cerebrales de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), su receptor TrkB y su relación con la plasticidad sináptica.

Todos los estudios comentados previamente tienen como denominador común el establecer una relación entre sonido y cambios en el comportamiento celular tanto macroscópicos como funcionales y moleculares. Pero, así mismo y como ya hemos comentado, en todos ellos existe un elemento intermediario como es la audición y procesamiento cerebral del sonido recibido. El proceso de audición no es exclusivo del periodo postnatal, sino que se ha demostrado que, tanto en el periodo fetal como en el perinatal en distintas especies animales, existe una capacidad de percepción y respuesta a los sonidos medioambientales a través de la vía auditiva (ver revisión de Querleu *et al.* 1998).

A pesar de que los estudios realizados en fetos podrían ser asimilables a nuestro modelo, los datos comentados previamente sugieren que la vía auditiva también puede estar implicada como elemento intermediario. Por ello, en nuestra opinión, dichos datos deben ser valorados como una relación indirecta entre el sonido como agente físico y el comportamiento celular, aunque no descartamos la posible existencia de un mecanismo de acción directo.

Pese a que en los comentarios anteriores se describen cambios en mecanismos moleculares en base a la presencia de estímulos sonoros, en la actualidad no existe un criterio claro de cómo el estímulo sonoro es capaz de inducir dichos cambios. En este sentido, se ha descrito que el sonido puede ejercer un efecto sobre el comportamiento celular a través de vías alternativas a la vía auditiva descrita previamente. Esto lo describen Conrad *et al.* en 2007 al detectar un incremento de hormona del crecimiento en sangre y una disminución de la presión sanguínea y frecuencia cardíaca en humanos expuestos a la acción de la música, proponiendo así una vía de actuación neuro-hormonal. Igualmente Gesi *et al.* en 2002 describen en ratas un incremento en la adrenalina y noradrenalina en la médula adrenal de estos animales tras su exposición a un ruido intenso.

Otro posible mecanismo alternativo de influencia de los sonidos sobre los organismos vivos es su efecto sobre la respuesta inmunitaria. Núñez *et al.* en 2002 demuestran que la música es capaz de revertir el efecto adverso del estrés optimizando la respuesta inmunológica frente al cáncer en ratones. Igualmente Zheng y Arizumi en 2007 demuestran el efecto depresor sobre la inmunidad humoral y celular de la exposición crónica al ruido en ratones.

En su conjunto, estos estudios vienen a demostrar que el sonido como agente físico puede ejercer efectos indirectos y difusos sobre el comportamiento celular en base a mecanismos distintos a la vía auditiva-neuronal, que podrían explicar en parte los estudios comentados en el primer bloque de esta discusión. Y ponen además de manifiesto la necesidad de clarificar la existencia de procesos directos de interacción entre el estímulo sonoro y el comportamiento celular.

3. INFLUENCIA DE LOS ESTÍMULOS SONOROS SOBRE EL COMPORTAMIENTO CELULAR A TRAVÉS DE MECANISMOS DIRECTOS

Una de las principales aportaciones de la presente tesis doctoral es la constatación de que una fuente de energía sonora es capaz de inducir de forma directa cambios específicos en el comportamiento de precursores neuronales.

El diseño experimental desarrollado en esta tesis se basa en la eliminación de todos los mecanismos intermedios comentados en el epígrafe anterior (transmisión/trasducción), de forma que la aplicación del estímulo sonoro se hace directamente sobre las células en cultivo.

Esto nos permite afirmar que existe una capacidad de respuesta directa a dichos estímulos, y que debe de existir algún tipo de “receptor”, específico o inespecífico, sensible al estímulo sonoro y capaz de influir/interferir en mecanismos moleculares que regulan procesos tan relevantes como la supervivencia, la replicación o la diferenciación de éstas células.

Existen estudios similares recogidos en la bibliografía que apoyan nuestros resultados, como son los de De Deyne and Kirsch-Volders en 1995 y Jones *et al.* en 2000, que demuestran en un sistema de fibroblastos gingivales cultivados *in Vitro* que la energía acústica, en rangos similares en intensidad y frecuencia a los empleados en nuestro modelo experimental, induce cambios específicos en el comportamiento de esas células con un incremento de su proliferación. Estos datos apoyan claramente nuestra interpretación de que la energía acústica es capaz de incrementar de forma directa el nivel de replicación de determinadas células en cultivo. Estos autores interpretan que este efecto se debe a la vibración directa inducida por el sonido en las células y, aunque no describen ningún mecanismo concreto, apuntan la posibilidad de que se produzcan cambios en la forma celular, niveles de mRNA o mecanismos de transporte intracelular de calcio (Dyson 1987; Hansson *et al.* 1988; Mortimer & Dyson 1988; Pienta & Coffey 1991; Davis & Ovington 1993; De Deyne & Kirsch-Volders 1995; Tjandrawinata *et al.* 1997). Estos mismos autores dejan abierta también la posibilidad de que el estímulo sonoro sea capaz de regular los niveles de factores de crecimiento en el entorno celular, bien por incrementar su síntesis o por facilitar la liberación mecánica de determinados factores por parte de la matriz extracelular. En este sentido y dado que nuestro grupo de investigación ha demostrado la dependencia de estas células, en cuanto al comportamiento mitótico, de factores de crecimiento como el FGF-2 y EFGF (Gato *et al.* 2005; Martín *et al.* 2006; Martín *et al.* 2009; Gato and Desmond 2009), nos planteamos como continuación del estudio de la presente tesis doctoral, el detectar cambios en los niveles de expresión/secreción de estos factores en el medio de cultivo y de sus respectivos receptores en los precursores neurales.

En cuanto a las bases moleculares de la influencia de la energía acústica en el comportamiento celular, existen referencias (Liedtke 2007) a la existencia de receptores celulares específicos de mecanotransducción “trpv (transient receptor potencial) ion channels” que han sido implicados en este proceso, incluida la recepción de sonidos en metazoos.

A pesar de que la identificación de los posibles receptores celulares para la energía sonora se escapa del objetivo de esta tesis doctoral, existen datos bibliográficos que demuestran la existencia de dichos sistemas. En este sentido, cabe destacar la existencia de orgánulos celulares especializados en la percepción de sonidos como es el órgano de Johnston en *Drosophila*. Dicho órgano se basa en el desarrollo de un sistema ciliar con una cubierta de matriz celular específica por parte de neuronas especializadas que, al ser estimulado por energía sonora, induce cambios en canales iónicos capaces de generar potenciales de acción. Este sistema de especialización constituye una versión primitiva, desde el punto de vista filogenético, del sistema auditivo. Sin embargo, difiere de nuestro sistema experimental (precursores neurales) en la necesaria presencia de orgánulos especializados, por lo que pensamos que no sería éste el sistema por el cual nuestro modelo experimental está respondiendo a los estímulos sonoros (Göpfert and Robert 2002; Todi *et al.* 2004; Yack 2004; Kernan 2007; Eberl and Boekhoff-Falk 2007; Sun *et al.* 2009).

En base a lo anteriormente expuesto, la presente tesis doctoral demuestra la capacidad de las células mesencefálicas de embriones de ratón para responder directamente a la energía sonora con cambios específicos en su comportamiento. No obstante, desconocemos los mecanismos moleculares implicados en este efecto, lo cual estimamos oportuno sea objeto de futuras investigaciones.

4. LAS CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL ESTÍMULO SONORO CONDICIONAN LA RESPUESTA CELULAR

Tanto los resultados presentados en nuestra tesis doctoral como en el estudio de Jones *et al.* en el 2000, demuestran que no todo estímulo sonoro es capaz de producir similares efectos sobre el comportamiento celular.

Jones *et al.* 2000 demuestra que cambios en el tiempo de exposición al estímulo sonoro pueden provocar efectos antagónicos en el nivel de replicación de fibroblastos gingivales en cultivo. Nuestros resultados muestran que cambios, no sólo en el tiempo de exposición (duración del sonido) sino en la organización armónica del estímulo o en el empleo de distintos componentes esenciales de la música de manera aislada, provocan diferentes respuestas tanto en la supervivencia como en la replicación y diferenciación neuronal.

Todos estos datos sugieren la necesidad de estudios más específicos que aborden el valorar qué tipo de estímulos sonoros son capaces de modificar el comportamiento celular.

El estudio que hemos realizado en la presente tesis no solamente demuestra la capacidad directa del sonido para influir en el comportamiento celular sino que pone de manifiesto que dicha capacidad depende selectivamente de las características del estímulo sonoro empleado. Como reflejan nuestros resultados, el efecto activador de la supervivencia, replicación y diferenciación celular inducido por el estímulo sonoro sobre las células del mesencéfalo embrionario en cultivo, es radicalmente distinto en función de las características del mismo. Siendo particularmente positivo el efecto de la música, mientras que el efecto del ruido es, en términos globales, negativo.

Esto coincide con lo expuesto en estudios previos, en los que se demuestran diferencias significativas en el grado de influencia del ruido y de la

música sobre el comportamiento celular (Wadhwa *et al.* 1999; Alladi *et al.* 2005; Chaudhury *et al.* 2006, 2008, 2009 y Chaudhury & Whadwa 2009). Estos datos vienen a indicar que la clave de dicho efecto pudiera estar en el grado de “armonía” del estímulo sonoro, ya que la diferencia fundamental entre los dos tipos de estímulos aplicados es el grado de organización sonora o “armonía”. Sin embargo no podríamos descartar la existencia de una cierta organización armónica en los componentes sonoros del ruido, aunque nosotros no lo percibamos como “armónico”. En este supuesto, la diferencia básica entre música y ruido pasaría a ser la existencia de un componente específico de la música que conocemos como pulso. El pulso se puede definir como la unidad temporal básica (aun así sub-divisible) de una obra musical, es un patrón de recurrencia regular que controla el movimiento de la música. No existen estudios científicos que avalen la relación directa entre el pulso musical y el comportamiento celular. No obstante, Kim *et al.* en 2006 encuentran diferencias similares entre el comportamiento de células del hipocampo de cerebro fetal sometidas a influencia sonora. Estos autores describen que el ruido ejerce una acción estresante, mediada posiblemente por los niveles de corticoesterona, que desemboca en un déficit de neurogénesis a nivel hipocampal. En el mismo estudio describen un incremento en la expresión de proteínas sinápticas inducido por la música a nivel hipocampal y un incremento de la neurogénesis. Estos datos en su conjunto apoyan, junto con los nuestros, que el tipo de estímulo sonoro es un factor clave en la influencia sobre el comportamiento celular.

En relación con esto, en nuestro estudio hemos pretendido, dentro de las posibilidades y limitaciones del diseño experimental, abordar el interrogante de si el componente que distingue a la música del ruido, el pulso, es el responsable en esencia del efecto de la música sobre el comportamiento de las células neuroepiteliales. Nuestros resultados demuestran que el pulso, como componente aislado, es capaz de ejercer una influencia directa sobre el comportamiento celular. Dicha influencia es parcialmente asimilable a la

influencia que ejerce la música, ya que es capaz de activar la neurogénesis en los cultivos de células mesencefálicas. En nuestra opinión, estos datos podrían indicar que el efecto de la música sobre el comportamiento celular es complejo y aunque parcialmente pudiera deberse a su componente más básico el pulso, posiblemente otros elementos de la música, o todos ellos en su conjunto, podrían estar colaborando de manera concomitante con el pulso en estos cambios de comportamiento.

CONCLUSIONES

1. El estímulo sonoro es capaz de modificar de forma directa el comportamiento de precursores neurales embrionarios en cultivo.
2. El estímulo sonoro musical mejora la supervivencia celular.
3. El estímulo sonoro musical incrementa la replicación celular.
4. El estímulo sonoro musical favorece la neurogénesis.
5. Existe una dependencia entre la magnitud del efecto y el tiempo de administración del estímulo, siendo máxima la activación en la replicación a las 24 horas mientras que, en el caso de la neurogénesis, ésta se potencia a las 72 horas.
6. El efecto del comportamiento celular parece depender del grado de organización armónica del estímulo sonoro. Así, el estímulo sonoro “ruido” no posee la capacidad de incrementar la replicación ni de favorecer la neurogénesis.
7. Un componente básico y exclusivo del estímulo sonoro musical, como es el pulso, es capaz de reproducir en gran medida los efectos del conjunto del estímulo musical, sugiriendo que las propiedades de dicho estímulo podrían radicar en componentes específicos del mismo.

La presente tesis doctoral sienta las bases de una línea de investigación que deja abiertas las puertas a futuros estudios sobre la influencia de los estímulos sonoros en los seres vivos.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain Derived Neurotrophic Factor*)

BrdU : 5-Bromo-2'-deoxiuridina

FBS: Suero bovino fetal

HCL: Ácido clorhídrico

HS: Suero de caballo

INCYL: Instituto de Neurociencias de Castilla y León

dH₂O: Agua destilada

DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*)

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*)

FGFR: Receptor de alta afinidad de FGF

FGF-2: Factor de crecimiento fibroblástico-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*)

HLGAG: Receptor de baja afinidad de FGF (*HeparinLike GlycosAminoGlycan*)

Leq, T: El nivel de presión sonora continuo equivalente (dB), (media energética del nivel de ruido promediado en el intervalo de tiempo de medida)

PBS: Phosphated Buffered Saline

p.c.: Post-coitum

PFA: Paraformaldehído

Ph: Tras la eclosión (*Post Hatching*)

r.p.m.: Revoluciones por minuto

S.N.A.: Sistema nervioso autónomo

S.N.C.: Sistema nervioso central

SSC.: Citrato sódico y NaCl

T.U.N.E.L.: TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling

TrkB: Receptor B de tirosin-kinasa

Trpv: Receptor de potencial transitorio (*Transient receptor potencial*)

U.V.A.: Universidad de Valladolid

W.A.M.: Wolfgang Amadeus Mozart

BIBLIOGRAFÍA

- ALDRIDGE D, GUSTORFFG, NEUGEBAUER L. (1995) A pilot study of music therapy in the treatment of children with developmental delay. *Complementary Therapies Med.* 3:197-205
- ALDRIDGE D. (1996) Chapter 2: Health as performance. "Music Therapy research and practice in Medicine: from out to the silence" (*Jessic Kingsley Publishers Ltd*). London. P.30.
- ALLADI PA, WADHWA S, SINGH N. (2002) Effect of prenatal auditory enrichment on developmental expression of synaptophysin and syntaxin 1 in chick brainstem auditory nuclei. *Neuroscience.* 114(3):577-90.
- ALLADI PA, ROY T, SINGH N, WADHWA S. (2005 Jun) Prenatal auditory enrichment with species-specific calls and sitar music modulates expression of Bcl-2 and Bax to alter programmed cell death in developing chick auditory nuclei. *Int J Dev Neurosci.* 3(4):363-73.
- ARABIN B, VAN STRAATEN I, VAN EYCK J. (1998) Fetal Hearing. *In: Kurjak A, ed. Text book of Perinatal Medicine. London, New York: Parthenon Publishers.* 756-75.
- ARABIN B. (2002) Music during pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 20:425-430.
- ÁLVAREZ-BUYLLA A, GARCÍA-VERDUGO JM. (2002 Feb) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci.* 1; 22(3):629-34. Review.
- BELLIN P, VAN EECKHOUT P, ZILBOVICIUS M. (1996) Recovery from non fluent aphasia after melodic intonation therapy. *Neurology.* 47: 1504-1511.
- BONAKDARPOUR B, EFTEKHARZADEH A, ASHAYERI H. (2003) Melodic intonation therapy in Persian aphasic patients. *Aphasiology.* 17: 75-95.
- BOUCHER V, GARCÍA JL, FLEURANT J, PARADIS J. (2001) Variable efficacy of rhythm and tone in melody-based interventions: implications of the assumption of a right-hemisphere facilitation in non fluent aphasia. *Aphasiology.* 15: 131-149.
- BURGESS WH, MACIAG T. (1989) The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 58:575-606. Review.
- CARNICERO E, GARRIDO JJ, ALONSO MT, SCHIMMANG T. (2001 May) Roles of fibroblast growth factor 2 during innervations of the avian inner ear. *J Neurochem.* 77(3):786-95.
- CHAUDHURY S, NAG TC, WADHWA S. (2006 Dec) Prenatal acoustic stimulation influences neuronal size and the expression of calcium-binding proteins (calbindin D-28K and parvalbumin) in chick hippocampus. *J Chem. Neuroanat.* 32(2-4):117-26. Epub 2006 Sep 7.

- CHAUDHURY S, NAG TC, WADHWA S. (2008 Jan) Calbindin D-28K and parvalbumin expression in embryonic chick hippocampus is enhanced by prenatal auditory stimulation. *Brain Res.* 29; 1191:96-106.
- CHAUDHURY S, NAG TC, WADHWA S. (2009 Feb) Effect of prenatal auditory stimulation on numerical synaptic density and mean synaptic height in the posthatch Day 1 chick hippocampus. *Synapse.* 63(2):152-9.
- CHAUDHURY S, WADHWA S. (2009 Oct) Prenatal auditory stimulation alters the levels of CREB mRNA, p-CREB and BDNF expression in chick hippocampus. *Int J Dev Neurosci.* 27 (6):583-90.
- CHEN DG, HUANG YF, ZHANG JY, QI GP. (1994) Influence of prenatal music and touch-enrichments on the IQ, motor development and behaviour of infants. *Chinese J Psychol.* 8:148-51.
- CHIKAHISA S, SEI H, MORISHIMA M, SANO A, KITAOKA K, NAKAYA Y, MORITA Y. (2006 May) Exposure to music in the perinatal period enhances learning performance and alters BDNF/TrkB signalling in mice as adults. *Behav Brain Res.* 15; 169(2):312-9.
- CONRAD C, NIESS H, JAUCH KW, BRUNS CJ, HARTL W, WELKER L. (2007 Dec) Overture for growth hormone: requiem for interleukin-6? *Crit Care Med.*; 35(12):2709-13.
- COPLAND A, (1994) "Cómo escuchar la música". *Fondo de cultura económica.* Madrid.
- COWLES A, BEATTY WW, NIXON SJ, LUTZ LJ, PAULK J, PAULK K, ROSS ED. (2003 Dec) Musical skill in dementia: a violinist presumed to have Alzheimer's disease learns to play a new song. *Neurocase.* 9(6):493-503.
- CRAIG CG, TROPEPE V, MORSHEAD CM, REYNOLDS BA, WEISS S, VAN DER KOOPY D. (1996 Apr) In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci.* 15; 16(8):2649-58.
- DAVIS SC, OVINGTON LG. (1993 Oct) Electrical stimulation and ultrasound in wound healing. *Dermatol Clin.* 11 (4):775-81. Review.
- DE DEYNE PG, KIRSCH-VOLDERS M. (1995 Jul) In vitro effects of therapeutic ultrasound on the nucleus of human fibroblasts. *Phys Ther.* 75(7):629-34.
- DEL CAMPO P, PALACIOS F, CAMPBELL DON G, PRIBRAM K, SCHAFER R M, LECOURT E, NAKKACH S, HEMSY DE GAINZA V, MENUHIM SIR Y, BANEGETA I, NARANJO C, WIGRAM T, DILEO CH, OLIVEROS P, GARCÍA PINTADO B R, FERNÁNDEZ M. (1997) "La música como proceso humano". (*Amarú ediciones*). Salamanca.
- DILEO CH (1993) "Music Therapy, International Perspectives". *Patxi del Campo, Definición de musicoterapia* p. 547 (*Jeffrey Books Editorial*). Philadelphia, USA
- DILEO CH (2006) Effects of music and music therapy on medical patients: a meta-analysis of the research and implications for the future. *J Soc Integr Oncol.* 4(2):67-70. Review.

- DONO R, TEXIDO G, DUSSEL R, EHMKE H, ZELLER R. (1998 Aug) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* 3; 17(15):4213-25.
- DUSH DM, HIRT ML, SCHROEDER HE. (1989 Jul) Self-statement modification in the treatment of child behaviour disorders: a meta-analysis. *Psychol Bull.* 106 (1):97-106.
- DYSON M (1987) Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 73,116-120.
- EBERL DF, BOEKHOFF-FALK G. (2007) Development of Johnston's organ in *Drosophila*. *Int J Dev Biol.* 51(6-7):679-87. Review.
- ERKKILÄ J, GOLD C, FACHNER J, ALA-RUONA E, PUNKANEN M, VANHALA M. (2008 Jun) The effect of improvisational music therapy on the treatment of depression: protocol for a randomised controlled trial. *BMC Psychiatry.* 28; 8:50.
- FERNÁNDEZ DEL OLMO M, CUDEIRO J. (2003): The timing in Parkinson's disease: effects of a rehabilitation programme based on rhythmic sound cues. *Proc. Soc. Neurosci.* 734:2
- FOSTER NA, VALENTINE ER. (2001 Jul-Sep): The effect of auditory stimulation on autobiographical recall in dementia. *Exp Aging Res.* 27(3):215-28.
- FREEDLAND RL, FESTA C, SEALY M, MCBEAN A, ELGHAZALY P, CAPAN A, BROZYCKI L, NELSON AJ, ROTHMAN J. (2002): The effects of pulsed auditory stimulation on various gait measurements in persons with Parkinson's Disease. *NeuroRehabilitation;* 17(1):81-7.
- GALZIE Z, KINSELLA AR, SMITH JA. (1997) Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol.* 75(6):669-85. Review.
- GATO A, MORO JA, ALONSO MI, BUENO D, DE LA MANO A, MARTÍN C. (2005 May) Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 284(1):475-84.
- GATO A, DESMOND ME. (2009 Mar) Why the embryo still matters: CSF and the neuroepithelium as interdependent regulators of embryonic brain growth, morphogenesis and histiogenesis. *Dev Biol.* 15; 327(2):263-72. Epub 2009 Jan 3. Review.
- GESI M, LENZI P, ALESSANDRI MG, FERRUCCI M, FORNAI F, PAPARELLI A. (2002 Feb) Brief and repeated noise exposure produces different morphological and biochemical effects in noradrenalin and adrenaline cells of adrenal medulla. *J Anat.* 200(Pt2):159-68.
- GHOSH A, GREENBERG ME. (1995 Jul) Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron.* 15(1):89-103.
- GLOVER H, KALINOWSKI J, RASTATTER M, STUART A. (1996 Oct). Effect of instruction to sing on stuttering frequency at normal and fast rates. *Percept Mot Skills.* 83(2):511-22.

GOLD C, VORACEK M, WIGRAM T. (2004 sept) Effects of music therapy for children and adolescents with psychopathology: a meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry*. 45(6):1054-63.

GÖPFERT MC, ROBERT D. (2002 May) The mechanical basis of Drosophila audition. *J Exp Biol*. 205(Pt 9):1199-208.

HAMBURGER V, Y HAMILTON H.L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*. 88:49-92

HANSSON HA, DAHLIN LB, LUNDBORG G, LÖWENADLER B, PALEUS S, SKOTTNER A. (1988) Transiently increased insulin-like growth factor I immunoreactivity in tendons after vibration trauma. An immunohistochemical study on rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 22(1):1-6.

HASLAM C, COOK M. (2002): Striking a chord with amnesic patients: evidence that song facilitates memory. *Neurocase*. 8(6):453-65.

HILLECKE T, NICKEL A, BOLAY HV. (2005 Dec): Scientific perspectives on music therapy. *Ann N Y Acad Sci*; 1060:271-82. Review.

HOWE TE, LÖVGREEN B, CODY FW, ASHTON VJ, OLDHAM JA. (2003 Jul) Auditory cues can modify the gait of persons with early-stage Parkinson's disease: a method for enhancing parkinsonian walking performance? *Clin Rehabil*; 17(4):363-7.

HUMMELSHEIM H. (1999 Dec): Rationales for improving motor function. *Curr Opin Neurol*. 12(6):697-701.Review.

HURT CP, RICE RR, MCINTOSH GC, THAUT MH. (1998): Rhythmic Auditory Stimulation in Gait Training for Patients with Traumatic Brain Injury. *J Music Ther*. 35(4):228-241.

IGLESIAS, P. (2004) "El diseñador de sonido: función y esquema de trabajo", ADE-Teatro Nº 101 (págs. 199-215).

JAUSET, J. (2008) "Música y neurociencia: la musicoterapia sus fundamentos, efectos y aplicaciones terapéuticas." Ed. UOC, Barcelona.

JONES H, FETH L, RUMPF D, HEFTI A, MARIOTTI A. (2000 Nov) Acoustic energy affects human gingival fibroblast proliferation but leaves protein production unchanged. *J Clin Periodontol*. 27(11):832-8.

KALCHEIM C, NEUFELD G. (1990 May) Expression of basic fibroblast growth factor in the nervous system of early avian embryos. *Development*.109 (1):203-15.

KALYANI AJ, RAO MS. (1998) Cell lineage in the developing neural tube. *Biochem Cell Biol*; 76(6):1051-68. Review.

KALYANI AJ, MUJTABA T, RAO MS. (1999 Feb) Expression of EGF receptor and FGF receptor isoforms during neuroepithelial stem cell differentiation. *J Neurobiol*. 5; 38(2):207-24.

KEEN AW. (2004) Using music as a therapy tool to motivate troubled adolescents. *Soc Work Health Care*. 39(3-4):361-73.

- KEMPER KJ, DANHAUER SC (2005 Mar): Music as therapy. *South Med J.* 98(3):282-8.
- KERNAN MJ. (2007 Aug) Mechanotransduction and auditory transduction in *Drosophila*. *Pflugers Arch.*; 454(5):703-20. Review.
- KIM H, LEE MH, CHANG HK, LEE TH, LEE HH, SHIN MC, SHIN MS, WON R, SHIN HS, KIM CJ. (2006 Mar) Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev.* 28(2):109-14.
- KIM S, KVERNO K, LEE EM, PARK JH, LEE HH, KIM HL. (2006 Aug) Development of a music group psychotherapy intervention for the primary prevention of adjustment difficulties in Korean adolescent girls. *J Child Adolesc Psychiatr Nurs.* 19(3):103-11.
- KIVI P. (2001) "Nuevos ensayos sobre la comprensión musical". *Paidós*. Traducción Verónica Canales, Barcelona, 2005.
- KUHN HG, WINKLER J, KEMPERMANN G, THAL LJ, GAGE FH. (1997 Aug) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.* 1; 17(15):5820-9.
- LATSHAW W. (1972 Feb) "Methods in mammalian embryology". *Can Vet J.* 13(2): 59-60.
- LAYMAN DL, HUSSEY DL, LAING SJ. (2002) Music therapy assessment for severely emotionally disturbed children: a pilot study. *J Music Ther.* 39(3):164-87.
- LIEDTKE W. (2007) TRPV channels' role in osmotransduction and mechanotransduction. *Handb Exp Pharmacol.* (179):473-87. Review.
- MARATOS AS, GOLD C, WANG X, CRAWFORD MJ. (2008 Jan) Music therapy for depression. *Cochrane Database Syst Rev.* 23; (1):CD004517. Review.
- MARTENS DJ, TROPEPE V, VAN DER KOY D. (2000 Feb) Separate proliferation kinetics of fibroblast growth factor-responsive and epidermal growth factor-responsive neural stem cells within the embryonic forebrain germinal zone. *J Neurosci.* 1;20(3):1085-95.
- MARTÍN C, BUENO D, ALONSO MI, MORO JA, CALLEJO S, PARADA C, MARTÍN P, CARNICERO E, GATO A. (2006 Sep) FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Dev Biol.* 15; 297(2):402-16.
- MARTÍN C, ALONSO MI, SANTIAGO C, MORO JA, DE LA MANO A, CARRETERO R, GATO A. (2009 Nov) Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *Int J Dev Neurosci.* 27(7):733-40.
- MAURITZ KH. (2002 May) Gait training in hemiplegia. *Eur J Neurol.* 9 Suppl 1:23-9; dicussion 53-61. Review.
- MCINTOSH GC, BROWN SH, RICE RR, THAUT MH. (1997 Jan) Rhythmic auditory-motor facilitation of gait patterns in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry,* 62(1):22-6.
- MICHELS U (1985) "Atlas de música". *Alianza Editorial*.S.A. Madrid.
- Tesis doctoral: "Caracterización y cuantificación de la influencia de la música como agente físico sobre el comportamiento de células madre neurales embrionarias en cultivo". Neysa Navarro Fernández

- MILLER RA, THAUT MH, AUNON J. (1996) Event-related brain wave potentials in an auditory-motor synchronization task. *Music Medicine*, Vol.2 R. Pratt & R. Spintge, Eds.: 76-84. MMB Music. St. Louis.
- MORTIMER AJ, DYSON M. (1988) The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol*.14 (6):499-506.
- NASKI MC, ORNITZ DM. (1998 Aug) FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci*. 1;3:d781-94. Review.
- NICKEL AK, HILLECKE T, ARGSTATTER H, BOLAY HV. (2005 Dec): Outcome research in music therapy: a step on the long road to an evidence-based treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 1060:283-93.
- NÚÑEZ MJ, MAÑÁ P, LIÑARES D, RIVEIRO MP, BALBOA J, SUÁREZ-QUINTANILLA J, MARACCHI M, MÉNDEZ MR, LÓPEZ JM, FREIRE-GARABAL M. (2002 Jul) Music, immunity and cancer. *Life Sci*. 19; 71(9):1047-57.
- PACCHETTI C, MANCINI F, AGLIERI R, FUNDARÒ C, MARTIGNONI E, NAPPI G. (2000 May-Jun): Active music therapy in Parkinson's disease: an integrative method for motor and emotional rehabilitation. *Psychosom Med*. 62(3):386-93.
- PANCHISION DM, MCKAY RD. (2002 Aug) The control of neural stem cells by morphogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*. 12(4):478-87. Review.
- PANICKER H, WADHWA S, ROY TS. (2002 Jul): Effect of prenatal sound stimulation on medio-rostral neostriatum/hyperstriatum ventral region of chick forebrain: a morphometric and immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat*. 24(2):127-35.
- PFUND R. (2000) Nurturing a child's spirituality. *J Child Health Care*. 4(4):143-8. Review.
- PIENTA KJ, COFFEY DS. (1991 Jan) Cellular harmonic information transfer through a tissue tensegrity-matrix system. *Med Hypotheses*. 34(1):88-95.
- PILON MA, MCINTOSH KW, THAUT MH. (1998 Sep) Auditory vs. visual speech timing cues as external rate control to enhance verbal intelligibility in mixed spastic-ataxic dysarthric speakers: a pilot study. *Brain Inj*. 12(9):793-803.
- QUERLEU D, RENARD X, VERSYP F, PARIS-DELRUE L, CRÉPIN G. (1988 Jul) Fetal hearing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 28(3):191-212. Review.
- RABALLO R, RHEE J, LYN-COOK R, LECKMAN JF, SCHWARTZ ML, VACCARINO FM. (2000 Jul) Basic fibroblast growth factor (Fgf2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 1; 20(13):5012-23.
- RAINA P, O'DONNELL M, ROSENBAUM P, BREHAUT J, WALTER SD, RUSSELL D, SWINTON M, ZHU B, WOOD E. (2005 Jun) The health and well-being of caregivers of children with cerebral palsy. *Pediatrics*.115 (6):e626-36.
- RAO MS. (1999 Aug) Multipotent and restricted precursors in the central nervous system. *Anat Rec*.15; 257(4):137-48. Review.

- RICKARD NS, TOUKHSATI SR, FIELD SE. (2005 Dec) The effect of music on cognitive performance: insight from neurobiological and animal studies. *Behav Cogn Neurosci Rev.* 4(4):235-61. Review.
- ROSSIGNOL S, JONES GM. (1976 Jul) Audio-spinal influence in man studied by the H-reflex and its possible role on rhythmic movements synchronized to sound. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 41(1):83-92.
- SAWAMOTO K, WICHTERLE H, GONZALEZ-PEREZ O, CHOLFIN JA, YAMADA M, SPASSKY N, MURCIA NS, GARCIA-VERDUGO JM, MARIN O, RUBENSTEIN JL, TESSIER-LAVIGNE M, OKANO H, ALVAREZ-BUYLLA A. (2006 Feb) New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science.* 3; 311(5761):629-32.
- SUN Y, LIU L, BEN-SHAHAR Y, JACOBS JS, EBERL DF, WELSH MJ. (2009 Aug) TRPA channels distinguish gravity sensing from hearing in Johnston's organ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11; 106(32):13606-11.
- SUNG HC, CHANG AM. (2005 Oct) Use of preferred music to decrease agitated behaviours in older people with dementia: a review of the literature. *J Clin Nurs.* 14 (9):1133-40. Review.
- THAUT MH, RICE RR, MCINTOSH GC, PRASSAS. (1993) The effect of auditory rhythmic cueing on temporal stride parameters and EMG patterns in hemiparetic gait of stroke rehabilitation. *J. Neurol. Rehabil.* 7: 9-16.
- THAUT MH, MCINTOSH GC, RICE RR, MILLER RA, RATHBUN J, BRAULT JM. (1996 Mar): Rhythmic auditory stimulation in gait training for Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 11(2):193-200.
- THAUT MH, MCINTOSH GC, RICE RR. (1997 Oct): Rhythmic facilitation of gait training in hemiparetic stroke rehabilitation. *J Neurol Sci.* 22; 151(2):207-12.
- THAUT MH, HURT CP, DRAGAN D, MCINTOSH GC. (1998): Rhythmic entrainment of gait patterns in children with cerebral palsy. *Dev. Med. Child Neurol.* 40: 15.
- THAUT MH, MCINTOSH KW, MCINTOSH GC, HOEMBERG V. (2001 Apr-Jun): Auditory rhythmicity enhances movement and speech motor control in patients with Parkinson's disease. *Funct Neurol.* 16(2):163-72.
- THAUT MH, KENYON GP, HURT CP, MCINTOSH GC, HOEMBERG V. (2002) Kinematic optimization of spatiotemporal patterns in paretic arm training with stroke patients. *Neuropsychologia;* 40(7):1073-81.
- THAUT MH. (2005 Dec): The future of music in therapy and medicine. *Ann N Y Acad Sci.* 1060:303-8. Review.
- TJANDRAWINATA RR, VINCENT VL, HUGHES-FULFORD M. (1997 May) Vibrational force alters mRNA expression in osteoblasts. *FASEB J.* 11 (6):493-7.
- TODI SV, SHARMA Y, EBERL DF. (2004 Apr) Anatomical and molecular design of the *Drosophila* antenna as a flagellar auditory organ. *Microsc Res Tech.* 15; 63(6):388-99. Review.

TRÍAS E, (2007). "El canto de las sirenas: argumentos musicales". *Galaxia Gutenberg*. Barcelona.

TROPEPE V, SIBILIA M, CIRUNA BG, ROSSANT J, WAGNER EF, VAN DER KOOY D. (1999 Apr) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol.* 1;208(1):166-88.

VACCARINO FM, SCHWARTZ ML, RABALLO R, NILSEN J, RHEE J, ZHOU M, DOETSCHMAN T, COFFIN JD, WYLAND JJ, HUNG YT. (1999 Mar) Changes in cerebral cortex size are governed by fibroblast growth factor during embryogenesis. *Nat Neurosci.*; 2(3):246-53. Erratum in: *Nat Neurosci* 1999 May; 2(5):485. *Nat Neurosci* 1999 Sep; 2(9):848.

VESCOVI AL, GALLI R, GRITTI A. (2001 May) The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomed Pharmacother.* 55(4):201-5. Review.

VINK AC, BIRKS JS, BRUINSMA MS, SCHOLTEN RJ. (2004) Music therapy for people with dementia. *Cochrane Database Syst Rev.* (3):CD003477. Review.

WADHWA S, ANAND P, BHOWMICK D. (1999 Jun): Quantitative study of plasticity in the auditory nuclei of chick under conditions of prenatal sound attenuation and over stimulation with species specific and music sound stimuli. *Int J Dev Neurosci.* 17(3):239-53.

WEISS S, DUNNE C, HEWSON J, WOHL C, WHEATLEY M, PETERSON AC, REYNOLDS BA. (1996 Dec) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* 1; 16(23):7599-609.

WHIPPLE J. (2004) Music in intervention for children and adolescents with autism: a meta-analysis. *J Music Ther.* 41(2):90-106.

WHITALL J, MCCOMBE WALLER S, SILVER KH, MACKO RF. (2000 Oct): Repetitive bilateral arm training with rhythmic auditory cueing improves motor function in chronic hemiparetic stroke. *Stroke.* 31(10):2390-5. Erratum in: *Stroke.* 2007 May; 38(5):e22.

WOLPERT L, (1998) Principles of development. *Oxford University Press*

YACK JE. (2004 Apr) The structure and function of auditory chordotonal organs in insects. *Microsc Res Tech.* 15; 63(6):315-37. Review.

ZHENG KC, ARIIZUMI M. (2007 Jan) Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *J Occup Health.* 49(1):32-8.