

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 987**

51 Int. Cl.:

A61N 2/02 (2006.01)

A61N 2/00 (2006.01)

A61N 1/36 (2006.01)

A61N 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2010 PCT/IL2010/000171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10100643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2010 E 10710911 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2405970**

54 Título: **Esquema de configuración magnética y sincronización para la estimulación magnética transcraneal**

30 Prioridad:

02.03.2009 US 156835 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.06.2018

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**MOSES, ELISHA y
ROTEM, ASSAF**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 987 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Esquema de configuración magnética y sincronización para la estimulación magnética transcraneal

Campo de la invención

Esta invención se refiere a dispositivos para la estimulación magnética transcraneal (TMS).

5 Antecedentes de la invención

La exposición a campos magnéticos se ha convertido en un método útil para fines terapéuticos. Un ejemplo de tal método está descrito por Litovitz (documento WO 2008/066509, de aquí en adelante '509). El documento '509 describe un método y un aparato para administrar un campo eléctrico a un cuerpo, que comprende administrar un campo magnético polarizado en una primera dirección a un cuerpo y dirigido a un objetivo deseado dentro del cuerpo, y cambiar la dirección de administración del campo magnético a una segunda dirección dirigida al objetivo deseado para inducir un campo eléctrico a través del objetivo deseado.

Otro ejemplo de tal método está descrito por Edrich *et al.* (documento US 6.066.084, de aquí en adelante '084). El documento '084 describe un método y un aparato para estimular y detectar magnéticamente los sistemas neuronales, y el método y el sistema comprenden estructuras helicoidales y otras estructuras espirales que pueden proporcionar un foco máximo de campo eléctrico en una región objetivo seleccionada.

La estimulación magnética transcraneal (TMS) es el dispositivo no invasivo líder para la estimulación de la actividad cerebral y nerviosa. Como tal, se observa un aumento importante en la variedad de aplicaciones de la TMS, desde tratamientos terapéuticos para la depresión o la migraña hasta la exploración de la actividad cerebral en un gran número de temas de investigación. La TMS es una nueva e innovadora adición al arsenal de las capacidades de exploración no invasiva y de las modalidades de intervención. El desarrollo de tales sondas es uno de los principales problemas de las estrategias terapéuticas y de diagnóstico para la neurología y la neurocirugía. La principal limitación de la TMS es la precisión y la especificidad de su región de activación. Actualmente, la TMS solo puede excitar zonas específicas del cerebro, principalmente en la corteza. Todavía no está claro qué es lo que determina la accesibilidad de las zonas del cerebro a la estimulación magnética.

La estimulación magnética transcraneal (TMS) es una tecnología no invasiva para estimular el cerebro que se presenta muy prometedora tanto para investigación como para uso clínico. Sin embargo, la tecnología básica se ha mantenido básicamente sin cambios, y los avances en su aplicación han sido contados. Los desarrollos recientes se han concentrado tanto en la capacidad de administrar pulsos a una velocidad de repetición de alta frecuencia como en llegar a regiones más profundas del cerebro. Esto ha sido motivado en parte por la esperanza de reemplazar la terapia electroconvulsiva (TEC) eficaz pero altamente molesta para la depresión que no responde a los fármacos. Sin embargo, una limitación principal de la TMS en esta fase de su desarrollo es la direccionalidad altamente específica del campo aplicado, que exige una aplicación dirigida con precisión que es extremadamente sensible al movimiento y a las perturbaciones. Tanto la localización como la orientación deben ser determinadas con alta resolución y una vez que se ha determinado la posición óptima, se debe mantener allí el imán durante todo el tratamiento. Se puede lograr un posicionamiento estable y reproducible utilizando las imágenes por MRI y el posicionamiento estereotáctico, pero un objetivo para el desarrollo de futuros imanes es un dispositivo que mejore la sensibilidad direccional y que permita un modo más eficiente de aplicar la TMS.

La sensibilidad direccional surge porque las neuronas sólo se excitan si sus axones están dirigidos con precisión a lo largo del campo eléctrico inducido.

Se ha demostrado recientemente que los cultivos neuronales son una importante herramienta que hace posible el desarrollo de la TMS, con los cuales se pueden explorar y ensayar nuevos tratamientos de combinación de imanes, fármacos y TMS, nuevos protocolos y otras innovaciones sin necesidad de sujetos animales ni humanos. La capacidad de crear respuestas potenciales de acción en los cultivos se basa en dos propiedades, a saber, el tamaño y la orientación.

La dependencia de la orientación surge porque la estimulación magnética de una neurona se produce en el axón, cuya proyección a lo largo del campo eléctrico inducido es el parámetro relevante para lograr la excitación. Utilizando cultivos de modelo cuasi-unidimensional, los axones se podrían dirigir para crecer a lo largo de anillos concéntricos con el imán, forzándolos así a tener una proyección extensa a lo largo del campo eléctrico inducido. Cabe señalar que, si fuera posible excitar las neuronas iniciando un potencial de acción en las dendritas, entonces cambiaría la situación y la direccionalidad no sería tan crucial. Ejemplos de tal excitación se describen a continuación en la presente memoria.

Otra característica importante que ha sido identificada es que la excitación inicial se logra estimulando una subpoblación de neuronas especialmente sensibles, que luego sirven como un centro de nucleación para el encendido de toda la red. En un cultivo que ha sido completamente desconectado mediante la aplicación de antagonistas de receptores (CNQX, APV y Bicuculina), solamente este pequeño subconjunto (aproximadamente 1 por ciento) es activo y responde a la estimulación magnética. Cuando el cultivo está conectado, este núcleo es

responsable de provocar una respuesta poblacional de todas las neuronas de la red. Si el tamaño del núcleo es demasiado pequeño, la aportación a la activación de las neuronas de la red no es suficiente para iniciar la respuesta de la población.

- 5 Para lograr una respuesta de la población a la estimulación magnética, se deben excitar potenciales de acción en un gran número de neuronas iniciadoras. En una red neuronal cuya orientación axonal sea aleatoria, este requisito es difícil de cumplir utilizando la TMS convencional, ya que la orientación de su campo inducido es constante y la probabilidad de que un número suficientemente grande de axones sea dirigido a lo largo de este campo es baja.

Sumario de la invención

- 10 La invención se define en la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes. Las realizaciones y métodos que no caen dentro del alcance de las reivindicaciones se describen con fines ilustrativos solamente.

Las realizaciones de la invención proporcionan un dispositivo para la excitación de las neuronas, en donde: dicho dispositivo comprende un conjunto de al menos dos bobinas separadas conectadas independientemente a una fuente de alimentación para suministrar energía eléctrica a dichas bobinas de tal modo que durante el uso:

- 15 dichas bobinas son accionadas independientemente,
- dichas al menos dos bobinas separadas son accionadas con desplazamiento de fases de corriente en el tiempo,
- dichas corrientes con desplazamiento de fases inducen al menos dos pulsos de campo magnético dependientes del tiempo, y
- la suma resultante de dichos al menos dos campos magnéticos es un campo magnético giratorio.
- 20 Se describe también más adelante un método para mejorar la excitación de las neuronas, comprendiendo el método someter una o más neuronas a un campo eléctrico giratorio, excitando de este modo a dicha neurona o dichas neuronas. En una realización, el campo eléctrico giratorio es la suma resultante de al menos dos campos eléctricos dependientes del tiempo.
- 25 En una realización, los al menos dos campos magnéticos dependientes del tiempo son inducidos pasando corrientes a través de al menos dos bobinas separadas e independientes.
- En una realización, las dos bobinas separadas e independientes son accionadas con desplazamiento de fases de dichas corrientes con el tiempo. En una realización, la suma resultante cambia de orientación con el tiempo.
- En una realización, los al menos dos campos dependientes del tiempo están en ángulo uno con respecto al otro. En una realización, el ángulo es un ángulo de 90 grados.
- 30 En una realización, las dos bobinas son accionadas independientemente por dos fuentes de alimentación.
- En una realización, las dos bobinas forman un ángulo una con respecto a la otra. En una realización, las dos bobinas están en ángulo recto una con respecto a la otra y son perpendiculares entre sí.
- En una realización, las corrientes pasadas a través de las al menos dos bobinas comprenden: una primera corriente que pasa a través de una primera bobina y una segunda corriente que pasa a través de una segunda bobina de tal modo que dicha primera corriente tiene una diferencia de fase con respecto a dicha segunda corriente. En una realización, la diferencia de fase de la primera corriente con respecto a la segunda corriente es una fase de 90 grados.
- 35 En una realización, la primera corriente es pulsada y la segunda corriente es pulsada.
- 40 En una realización, el número de pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente es uno o es mayor que uno.
- En una realización, el pulso de la primera corriente comprende una primera onda sinusoidal y el pulso de la segunda corriente comprende una segunda onda sinusoidal de tal modo que la segunda onda sinusoidal se queda un cuarto de ciclo detrás de la primera onda sinusoidal.
- 45 En una realización, el pulso de la primera corriente comprende un período de la primera onda sinusoidal y el pulso de la segunda corriente comprende un período de la segunda onda sinusoidal.
- En una realización, el campo eléctrico giratorio se genera utilizando un conjunto de electrodos que comprende al menos dos pares de electrodos. En una realización, se aplican al menos dos voltajes a los al menos dos pares de electrodos en el conjunto de electrodos. En una realización, los voltajes varían con el tiempo. En una realización, los

al menos dos pares de electrodos están en ángulo uno con respecto al otro. En una realización, los dos pares de electrodos están en ángulo recto uno con respecto al otro y son perpendiculares entre sí.

La excitación neuronal comprende excitación axonal. Esta se puede aplicar al cerebro de un sujeto. Las realizaciones de la invención se pueden utilizar para diagnóstico o para tratamiento.

- 5 La excitación neuronal se puede aplicar a un cultivo de neuronas. Se detecta la respuesta de dicho cultivo a dicha excitación neuronal.

El campo giratorio puede excitar los axones de dichas neuronas, en donde la dirección del eje largo de un axón crea un ángulo distinto de cero con respecto a la dirección del eje largo de un segundo axón. El campo eléctrico giratorio puede excitar al menos el número mínimo de neuronas necesario para generar una respuesta en una población de neuronas, generando de este modo una respuesta global en dicha población de neuronas.

10

Los ejes largos de los axones de al menos dos de dichas neuronas pueden no ser paralelos.

En una realización, se aplican al menos dos voltajes a los al menos dos pares de electrodos en dicho conjunto de electrodos. En una realización, los dos voltajes varían con el tiempo. En una realización, los voltajes aplicados a los al menos dos pares de electrodos comprenden: un primer voltaje aplicado al primer par de electrodos y un segundo voltaje aplicado a un segundo par de electrodos de tal modo que el primer voltaje tiene una fase con respecto al segundo voltaje. En una realización, la fase del primer voltaje con respecto al segundo voltaje es una fase de 90 grados.

15

En una realización, el primer voltaje es pulsado y el segundo voltaje es pulsado.

En una realización, el pulso del primer voltaje comprende una primera onda sinusoidal y el pulso del segundo voltaje comprende una segunda onda sinusoidal de tal modo que la segunda onda sinusoidal se queda un cuarto de ciclo detrás de la primera onda sinusoidal.

20

Breve descripción de los dibujos

El tema considerado como la invención se señala particularmente y se reivindica claramente en la parte final de la memoria descriptiva. La invención, sin embargo, tanto en organización como en método de operación, junto con los objetivos, características y ventajas de la misma, se puede entender mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se lee con los dibujos adjuntos en los que:

25

La Figura 1 muestra realizaciones de una configuración de bobina cruzada; a) Una imagen de las bobinas reales utilizadas en el experimento. Las dos bobinas están entrelazadas en planos perpendiculares y están conectadas a dos estimuladores independientes; b) Una imagen de la esfera de vidrio hecha a la medida para encajar dentro de la bobina cruzada. El cubreobjetos de vidrio y el medio fueron insertados a través de una ranura ubicada en la parte superior de la esfera. El cubreobjetos está colocado sobre una base aplanada en el fondo de la esfera y es visto a través de un orificio de observación, que está sellado con vidrio ópticamente transparente. c) Esquema de la configuración: el cubreobjetos (parte inferior) está colocado en una esfera de vidrio dentro de la bobina cruzada mientras que un microscopio invertido monitoriza la actividad neuronal. Todas las barras a escala son de 2 cm; d) El campo eléctrico inducido en la bobina cruzada se mide utilizando una bobina de captación orientada sobre el plano de una de las bobinas (denominada bobina de plano horizontal, línea continua) y sobre el plano de la segunda bobina (denominada bobina de plano vertical, línea de puntos). El estimulador Magstim se carga al 100 % y el HMS se carga con 3,5 kV (véase detalles en la sección de métodos); e) Una reconstrucción del campo eléctrico efectivo creado a partir de la suma de los dos componentes perpendiculares medidos en a). El campo efectivo se reconstruyó para una ubicación específica justo dentro de los polos de la bobina cruzada (Figura 1c). El campo efectivo completa 3/4 de un ciclo de espiral durante el ciclo de pulsos magnéticos, como se indica por las flechas negras; f) Configuración de la bobina cruzada para experimentos con ratas. La cabeza de la rata se coloca dentro de la bobina cruzada. Los electrodos EMG registran los potenciales musculares en el gastrocnemio. Los datos EMG se digitalizan y se sincronizan con los pulsos de la TMS de campo giratorio (rTMS) para evaluar la respuesta motora a la rTMS.

30

35

40

45

La Figura 2 demuestra ejemplos de respuesta a la estimulación; a) la respuesta del cultivo neuronal 2D a rTMS. Se tomaron imágenes de la actividad del cultivo a través del orificio de observación (véase la figura 1b). El cuadro negro indica la región de interés sobre la cual se hizo el promedio de las señales. La línea blanca de puntos indica los bordes del cubreobjetos sobre los que creció el cultivo; b) La fluorescencia dependiente de calcio de la región de interés en a). Las líneas de puntos son sucesos de estimulación magnética utilizando las bobinas cruzadas, mientras que las negras son cuando se utiliza sólo una de las bobinas. La intensidad de cada estimulación se observa en teslas. Se debe señalar que la actividad es inducida por las bobinas cruzadas ya con 0,8 T, mientras que una única bobina solo inducirá actividad a aproximadamente 1,5 T; c) La respuesta de la corteza motora de la rata a rTMS. Gráficos de registro de EMG del músculo gastrocnemio cuando se utilizan las bobinas cruzadas para estimular a una rata en diferentes lugares. Cada lugar se ilustra a la derecha del rastro de respuesta representando la cruz negra la bobina cruzada. La última fila se realizó después de la dislocación cervical de la rata. La barra a escala es 200 μ V; d) Una comparación entre las dos últimas filas de c). La línea continua es la respuesta media de la rata a la rTMS

50

55

sobre su cabeza antes de la dislocación y la curva de puntos es la respuesta media de la rata después de la dislocación.

La Figura 3 ilustra ejemplos de simulaciones de campos eléctricos inducidos giratorios. Fila superior: rastros de voltaje idealizados: la línea de puntos representa la carga de voltaje en las bobinas de puntos de las filas media e inferior, la línea continua representa la carga de voltaje en las bobinas sólidas. Las barras verticales sólidas indican el punto de tiempo para el que se calcularon los campos que siguen. Fila intermedia, bobina cruzada: dos bobinas circulares están conectadas a dos fuentes de corriente independientes que produce cada una un único pulso sinusoidal (como se describe en la fila superior). El campo eléctrico resultante sobre la superficie de una esfera situada dentro de las bobinas es simulado (magnitud según el código de color, dirección mediante flechas blancas). a) Después de que la bobina horizontal complete 1/4 de ciclo, la bobina vertical comienza su pulso y domina la inducción; b) Un cuarto de ciclo más tarde, ambas bobinas inducen un campo igual y el campo efectivo es diagonal. c) Después de otro 1/4 de ciclo, la bobina horizontal toma el control por completo y el campo resultante gira 90° con respecto a la orientación original en a). El punto del campo giratorio ("punto caliente") está localizado en la superficie de la esfera en el punto de cruce de las dos bobinas (elipse de puntos). Para detalles de la simulación, véase más adelante en la presente memoria. Fila inferior, bobina de hoja de trébol: 2 pares de bobinas de forma de ocho modificadas están conectadas a dos fuentes de corriente independientes que produce cada una un único pulso sinusoidal (la carga de voltaje en las bobinas está descrita en la fila superior). El campo eléctrico resultante a 3 cm por encima de la bobina es simulado (magnitud según el código de color, dirección mediante flechas blancas). a) Después de que el par sólido completa 1/4 de ciclo, el par de puntos comienza su pulso y domina la inducción, dando como resultado un campo vertical. b) 1/4 de ciclo más tarde, ambas bobinas inducen un campo igual y el campo efectivo es diagonal. c) Después de otro 1/4 de ciclo, el par sólido toma el control por completo y el campo resultante es horizontal. Durante un ciclo completo, la orientación del campo inducido gira, barriendo 270°, mientras que la excitación máxima permanece en el centro de la hoja de trébol ("punto caliente"). Para detalles de la simulación, ver el material suplementario.

La Figura 4 es una tabla resumen de los resultados de la estimulación magnética de cultivos 2D. El umbral de activación está marcado para cada configuración de bobinas magnéticas. Las entradas en blanco marcan la falta de una respuesta observable a la estimulación.

La Figura 5 es una simulación esquemática de la estimulación de un cultivo cuyos axones celulares están orientados aleatoriamente. Cada célula proyecta un único axón (líneas continuas o de puntos) a) Aplicando un pulso magnético corto con una orientación única fija (la flecha negra indica la dirección del campo eléctrico inducido por el pulso magnético). Solamente se excita una célula cuyo axón (línea de puntos) está orientado en paralelo a la dirección del campo eléctrico inducido. b) Aplicando un pulso magnético giratorio corto (el arco indica la extensión de la rotación del campo eléctrico inducido por el pulso magnético). Todas las células cuyas orientaciones de axones se encuentran dentro del arco del campo eléctrico giratorio se excitan, lo que conduce a una respuesta poblacional de la red. c) Aplicando un pulso magnético largo con una orientación fija. Todas las células con dendritas orientadas en paralelo a la dirección del campo eléctrico inducido se excitan (las células excitadas están marcadas con círculos de puntos), lo que lleva a una respuesta poblacional de la red.

La Figura 6 es un diagrama esquemático de una realización del dispositivo propuesto. Los dos ignitrones (I1 e I2) son activados por un generador de disparo. Conectando I2 a través de la conexión 1 resulta un pulso monopolar, mientras que conectándolo a través de la conexión 2 resulta un pulso bipolar. El ignitrón I1 puede ser reemplazado por un tiristor, mientras que I2 puede ser reemplazado por un diodo.

La Figura 7 ilustra una realización de un estimulador más grande con un condensador C de 4,8 mF y una carga de voltaje máxima de 6,5 kV capaz de administrar aproximadamente 10 T con un tiempo de subida de 1 ms. El ignitrón I1 se utilizó para iniciar la descarga a través de la bobina y el ignitrón I2 se utilizó para acortar la bobina y detener la descarga a través de la bobina.

La Figura 8 es un resumen de la respuesta de estimulación magnética tanto en cultivos neuronales 2D como en ratas anestesiadas.

La Figura 9 demuestra una realización de dependencia de la orientación; La bobina de hoja de trébol alivia la dependencia de orientación de la estimulación magnética: se utilizó el campo eléctrico calculado inducido por la bobina de hoja de trébol (figura 3) para simular la generación de potencial de acción en un axón con 1 µm de diámetro y 1 mm de longitud que contiene sodio, potasio sensible al voltaje y fuga de conductancias (véase Material y métodos). Para caracterizar el umbral a diferentes orientaciones del axón con respecto a la bobina, se aumentó la amplitud del pulso de corriente hasta que el estímulo magnético desencadenó un potencial de acción. La amplitud máxima del campo eléctrico que fue inducido a esta amplitud de corriente por cada una de las bobinas se representa aquí frente al ángulo entre el axón y el eje de las x. La simulación predice que el umbral de generación de potencial de acción por estimulación magnética depende solo débilmente de la orientación de la bobina, si se utiliza una bobina de hoja de trébol.

La Figura 10 ilustra un ejemplo de estimulación eléctrica de cultivos neuronales. a) Un rastro de voltaje típico del pulso eléctrico utilizado para estimular cultivos. La duración del pulso (DT) puede variar continuamente entre 10 µs y

10 ms. b) Un histograma semilogarítmico del umbral de duración del pulso, la duración mínima del pulso requerida para estimular un cultivo. Los cultivos que son excitables tanto magnéticamente como eléctricamente se muestran en una curva continua. Los cultivos que solo pueden ser excitados utilizando un pulso eléctrico se muestran en una curva de puntos.

5 La Figura 11 es una imagen fluorescente de un crecimiento de neuronas que expresan GFP en cultivo. El cultivo fue extendido sobre un cubreobjetos de 30 mm (el arco blanco en la figura se extiende sobre el borde del cubreobjetos). Se puede rastrear el axón de la neurona ya que sigue la circunferencia del cubreobjetos tangencialmente a lo largo de 3 mm.

10 La Figura 12 demuestra los efectos de la anestesia en el umbral de estimulación. El umbral magnético para la estimulación medular de una rata se midió 15 veces a lo largo de un curso de tiempo de 10 horas (cruces negras). Se administró una solución de xilazina y ketamina dos veces durante el experimento (líneas verticales primera y sexta) y se administró una solución que contenía sólo ketamina en cinco veces adicionales (líneas verticales restantes). Se ajustó una curva de relajación a los datos, asumiendo que el efecto anestésico de la xilazina aumenta gradualmente hasta un pico después de la inyección y luego se relaja de forma exponencial hasta las medidas de la línea base.

15 La Figura 13 es la reconstrucción de la bobina de hoja de trébol densa. Izquierda: Vista ampliada del centro de la bobina. Las líneas representan los alambres de cada bucle de la bobina. Las 10 líneas de la parte superior e inferior en forma de v corresponden a las hojas verticales y las 9 líneas de izquierda y derecha en forma de v a las hojas horizontales. Derecha: Las líneas circulares cerradas representan la vista general de una de las hojas de la bobina. La bobina no está en espiral. Cada bucle interno es una copia a escala del bucle externo.

20 La Figura 14 muestra las respuestas de cultivos unidimensionales a la estimulación eléctrica con orientación y duración de pulso variables. a) El cultivo de la línea continua respondió a estímulos breves ($\sim 0,1$ ms), mientras que el cultivo de la línea de puntos respondió sólo a estimulación más larga de 1 ms. El umbral disminuye con la duración del pulso, después alcanza un estado estacionario saturado bajo (no se muestra). b) Respuesta de los cultivos a la rotación de la dirección del campo con respecto a la orientación del cultivo. El cultivo de la línea de puntos tiene una respuesta constante en todos los ángulos, mientras que el cultivo de la línea continua (a duraciones de pulso cortas) es mucho más fácil de excitar cuando el campo eléctrico está a 0 grados, lo que significa paralelo a la orientación del cultivo. c) Dependencia angular del umbral que se muestra en (b), como una función del coseno del ángulo. Para el cultivo de la línea continua, hay una relación lineal clara, lo que indica que hay de hecho proyección axonal en la dirección del campo que determina el umbral para la excitación. El cultivo de la línea de puntos es insensible a la orientación del campo eléctrico.

25 Se apreciará que, por simplicidad y claridad de la ilustración, los elementos mostrados en las figuras no han sido dibujados necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos de los elementos pueden estar exageradas en relación con otros elementos para claridad. Además, cuando se considere apropiado, los números de referencia se pueden repetir entre las figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

Descripción detallada de la presente invención

30 En la siguiente descripción detallada, se indican numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención se puede poner en práctica sin estos detalles específicos. En otros casos, los métodos, procedimientos y componentes bien conocidos no se han descrito en detalle, para no hacer confusa la presente invención.

Una limitación principal de la TMS en esta fase de su desarrollo es la direccionalidad altamente específica del campo aplicado, que exige una aplicación dirigida con precisión que es extremadamente sensible al movimiento y a las perturbaciones. Tanto la localización como la orientación deben ser determinadas con alta resolución y una vez que se ha determinado una posición óptima, el imán se debe mantener allí durante todo el tratamiento.

45 La sensibilidad direccional surge porque las neuronas sólo se excitan si sus axones están dirigidos con precisión a lo largo del campo eléctrico inducido. Esta invención proporciona, en una realización, una tecnología que gira el campo magnético aplicado, haciendo posible la excitación de las neuronas cuyos axones se dirigen en muchas direcciones diferentes.

50 La dependencia de la orientación surge porque la estimulación magnética de una neurona se produce en el axón, cuya proyección a lo largo del campo eléctrico inducido es el parámetro relevante para lograr la excitación. Utilizando cultivos de modelo cuasi-unidimensional, se proporciona un método para dirigir los axones para que crezcan a lo largo de anillos concéntricos con el imán, forzándolos así a tener una proyección extensa a lo largo del campo eléctrico inducido en una realización. Cabe señalar que, si fuera posible excitar las neuronas iniciando un potencial de acción en las dendritas, entonces cambiaría la situación y la direccionalidad no sería tan crucial.

55 Otra característica importante que ha sido identificada es que la excitación inicial se logra estimulando una subpoblación de neuronas especialmente sensibles, que luego sirven como un centro de nucleación para el encendido de toda la red. En un cultivo que ha sido completamente desconectado mediante la aplicación de

antagonistas de receptores (CNQX, APV y Bicuculina), solamente este pequeño subconjunto (aproximadamente 1 por ciento) es activo y responde a la estimulación magnética. Cuando el cultivo está conectado, este núcleo es responsable de provocar una respuesta poblacional de todas las neuronas de la red. Si el tamaño del núcleo es demasiado pequeño, la aportación a la activación de las neuronas de la red no es suficiente para iniciar la respuesta de la población.

Para lograr una respuesta de la población a la estimulación magnética, se deben excitar potenciales de acción en un gran número de neuronas iniciadoras. En una red neuronal cuya orientación axonal sea aleatoria, este requisito es difícil de cumplir utilizando la TMS convencional, ya que la orientación de su campo inducido es constante y la probabilidad de que un número suficientemente grande de axones sea dirigido a lo largo de este campo es baja.

Por lo tanto, induciendo un campo eléctrico giratorio cuya orientación barre un amplio intervalo de ángulos durante un solo pulso, muchos axones se podrían excitar todos a la vez y la respuesta poblacional estaría asegurada. En la descripción que sigue, se describen los métodos para lograr tal rotación, y se muestra la respuesta resultante de las preparaciones neuronales.

Estimulación magnética *in vitro*

Como parte de la investigación sobre la interacción de pulsos magnéticos con neuronas, se desarrollaron nuevas capacidades e interpretaciones de los parámetros que determinan la interacción efectiva del pulso magnético sobre el cerebro. Se utiliza una combinación de técnicas físicas y nuevos métodos de cultivo celular para determinar los parámetros óptimos para la aplicación de la TMS. Estos parámetros son en gran parte espaciales y geométricos, y están relacionados con la forma del sustrato neural y la direccionalidad del campo magnético. En particular, ahora está claro que la dirección de los axones debe coincidir con la dirección del campo eléctrico que es inducido por la estimulación magnética con el fin de maximizar el efecto de esta estimulación.

La direccionalidad, el tiempo de subida y la cooperatividad limitan el efecto de la estimulación magnética

La neurofísica de la estimulación de campo externo se puede simplificar utilizando la ecuación de cable pasivo (véase A. L. Hodgkin, W. A. Rushton, Proc. Royal Soc. B 133, 444 (1946) y B. J. Roth, P. J. Bassar, IEEE Trans Biomed. Eng. 37, 588 (1990)) que calcula el voltaje que un campo eléctrico externo induce sobre la membrana de un cable (en este caso, el cable es una neurita) cuya capacidad y resistencia son conocidas. Esta ecuación enfatiza el papel de dos parámetros relevantes en la estimulación de las neuritas. En primer lugar, las neuronas que responden con más fuerza al campo eléctrico inducido son aquellas cuya neurita - axón o dendrita - se encuentra paralela al campo eléctrico. Esta observación es clara a partir de consideraciones teóricas y ha sido la base para obtener por primera vez la estimulación magnética de las neuronas del sistema nervioso central (CNS) utilizando cultivos unidimensionales. En segundo lugar, las neuritas cuyo tiempo de subida de la membrana es mucho más largo que el tiempo de subida de los pulsos externos no responderán a la estimulación. Dado que el tiempo de subida de los estimuladores magnéticos comerciales no supera los 100 μ s (cien microsegundos) y el tiempo de subida de la membrana de las dendritas es del orden de 1 ms (un milisegundo), la excitación de las neuronas se inicia casi exclusivamente en el axón. Una derivación más detallada se puede encontrar en A. Rotem and E. Moses, Biophys. J 94, 5065, 2008. Además, la respuesta colectiva de una red de neuronas en el cerebro vivo o *in vitro* no se puede iniciar desde el encendido de una sola célula. Por el contrario, generalmente requiere un número crítico de neuronas iniciadoras que se encienden casi simultáneamente con el fin de desencadenar un estallido poblacional que se pueda observar *in vivo* o en cultivos neuronales grandes *in vitro*. Los detalles se pueden encontrar en I. Breskin, J. Soriano, E. Moses, T. Tlusty, Phys. Rev. Lett. 97, 188102 (Nov 3, 2006).

Los tres factores mencionados antes limitan una estimulación magnética satisfactoria de una red de neuronas: ellos requieren que varias células vecinas en la red tengan axones orientados en paralelo al campo eléctrico inducido. Sin embargo, la dirección del campo magnético de una bobina determinada es fija, y también lo es la del campo eléctrico inducido. Esto significa que en una red donde las neuronas tienen axones orientados aleatoriamente, la cantidad de neuronas que pueden ser excitadas es muy pequeña, y no suficiente para una respuesta colectiva de la red (Figura 5a). Esta puede ser la principal razón por la que es tan difícil excitar cultivos bidimensionales *in vitro* y regiones corticales cuya orientación axonal no es homogénea.

Campos eléctricos giratorios

En una realización, para resolver el problema causado por la anisotropía de la orientación de los axones, se emplea un campo eléctrico dependiente del tiempo, que se extiende a través de todo un intervalo de ángulos. En una realización, esto se obtiene utilizando dos bobinas, cuyos campos magnéticos son perpendiculares entre sí y cuyas corrientes tienen un desplazamiento de fase una de la otra de un cuarto de ciclo. El campo eléctrico resultante gira en el espacio durante el ciclo de pulso, llevando a la excitación de células adicionales cada vez que hace un barrido a través de su orientación. Dado que el ciclo no dura más que varios cientos de microsegundos (μ s), todas estas células se estimulan bastante próximas en el tiempo, asegurando una respuesta colectiva de la red (Figura 5b).

Los métodos de campos magnéticos giratorios requieren la inducción de un campo giratorio. A continuación, en esta memoria se mostrará cómo se consigue la inducción de un campo giratorio, y que los pulsos estimuladores mejorados de esta invención se dirigen a un mayor número de neuronas para excitación, tanto en la placa de cultivo

como en el cerebro vivo. Estas herramientas conceptualmente nuevas pueden hacer posible el acceso a zonas del cerebro que actualmente no son sensibles a la TMS, y proporcionar una excitación fácil de los cultivos bidimensionales, que son más accesibles como un sistema modelo que los cultivos unidimensionales. En una realización, tales técnicas de estimulación harán posible el diagnóstico del cerebro y de los componentes del sistema nervioso. Tales métodos de estimulación harán posible el tratamiento de afecciones neurológicas y de otras afecciones clínicas. Tales técnicas de estimulación serán capaces de predecir la aparición o el riesgo relativo de un sujeto a desarrollar una afección relacionada con el sistema nervioso.

Teoría – aumentar el tiempo de subida de la estimulación magnética sin reducir el campo eléctrico inducido. La estimulación dendrítica requiere anchuras de pulsos del orden de 1 ms. Para obtener una amplitud dada del campo eléctrico inducido durante un período de tiempo más largo, se necesita escalar el campo magnético linealmente con la duración del pulso. Esto se debe a que el campo eléctrico inducido depende linealmente de la pendiente de tiempo del campo magnético, que disminuye a medida que los pulsos se hacen más anchos. Para una configuración de bobina dada descargada con un pulso sinusoidal con una frecuencia dada ω , el campo eléctrico inducido E en algún punto es una función del pico del campo magnético B :

$$E = A \frac{\partial B(t)}{\partial t} = A \frac{\partial B_0 e^{i\omega t}}{\partial t} = i\omega AB \Rightarrow |E| \propto \omega B$$

Con i la unidad compleja y el parámetro de superficie $[A] = m^2$ tiene en cuenta la geometría del problema. La amplitud del pico del campo magnético es establecida por los parámetros del condensador. La relación se puede obtener a partir de la consideración de la energía ya que la energía almacenada en el condensador antes de la descarga es teóricamente igual a la energía del campo magnético creado por la bobina:

$$\int_V \frac{B^2}{2\mu} dV = \frac{LI^2}{2} = \frac{CV^2}{2} \Rightarrow B \propto \sqrt{CV}$$

Para una bobina magnética con una inductancia L , la frecuencia ω de un pulso descargado a través de la bobina desde un condensador de capacitancia C viene dada por:

$$\omega = 1/\sqrt{LC}$$

Combinando las tres relaciones anteriores se obtiene:

$$|E| \propto \omega B \propto \frac{\sqrt{CV}}{\sqrt{LC}} \propto \frac{V}{\sqrt{L}}$$

Este análisis revela las dos rutas para aumentar la duración del pulso:

Aumentar la inductancia L : en este caso se debe aumentar también V cuadráticamente con L para mantener E constante. Aumentar L significa añadir más vueltas a un sistema de bobina ya muy lleno. El aumento de la carga V en el condensador obtiene una nueva infraestructura y medidas de seguridad que son adecuadas con voltajes más altos en el circuito.

Aumentar la capacitancia C : E es independiente de C , de modo que aumentar la capacitancia aumentará el tiempo del ciclo sin hacer frente a efectos secundarios y es un método preferido para extender los pulsos magnéticos.

Los métodos de excitación dendríticos pueden requerir que el campo eléctrico se aplique durante períodos de tiempo más largos. A continuación, se mostrará en la presente memoria cómo se consigue la aplicación de tales campos eléctricos, y que los pulsos de estimulación mejorados de esta invención se dirigen a un número mayor de neuronas para excitación, tanto en la placa de cultivo como en el cerebro vivo. Estas herramientas conceptualmente nuevas pueden hacer posible el acceso a zonas del cerebro que actualmente no son sensibles a la TMS, y proporcionar una excitación fácil de los cultivos bidimensionales, que son más accesibles como un sistema modelo que los cultivos unidimensionales. Tales técnicas de estimulación pueden hacer posibles diagnósticos cerebrales o tratamiento de afecciones neurológicas y de otras afecciones clínicas.

En esta memoria se describe un sistema para la excitación de neuronas, comprendiendo el sistema someter una neurona a un campo eléctrico giratorio, excitando de este modo la neurona.

El campo eléctrico giratorio puede ser la suma de al menos dos campos eléctricos dependientes del tiempo. En una realización, los al menos dos campos eléctricos dependientes del tiempo son inducidos por al menos dos campos

magnéticos dependientes del tiempo. En una realización, los al menos dos campos magnéticos dependientes del tiempo son inducidos pasando corrientes a través de al menos dos bobinas.

Las dos bobinas pueden estar conectadas independientemente a dos fuentes de alimentación. Alternativamente, las dos bobinas y las dos fuentes de alimentación son parte del sistema.

- 5 El sistema puede comprender además una unidad de detección de señales eléctricas, una unidad de formación de imágenes o una combinación de las mismas. En una realización, las dos bobinas son perpendiculares entre sí.

En una realización, las corrientes pasadas a través de las al menos dos bobinas comprenden: una primera corriente que pasa a través de una primera bobina y una segunda corriente que pasa a través de una segunda bobina de tal modo que la primera corriente tiene una fase de 90 grados con respecto a la segunda corriente. En una realización, la fase de 90 grados representa un retraso de 1 cuarto de ciclo de la primera corriente detrás de la segunda corriente.

- 10

En una realización, la primera corriente es pulsada y la segunda corriente es pulsada. En una realización, los pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente son de la misma frecuencia de pulso. En una realización, los pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente son del mismo patrón de onda. En una realización, los pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente son de la misma amplitud de pico. En una realización, el número de pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente es uno. En una realización, el número de pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente es mayor que uno.

- 15

En una realización, el patrón de pulso comprende: el número de pulsos, el tiempo de cada pulso, el tiempo entre pulsos o una combinación de los mismos.

- 20 En una realización, el pulso de la primera corriente comprende una primera onda sinusoidal y el pulso de la segunda corriente comprende una segunda onda sinusoidal de tal modo que la segunda onda sinusoidal se queda un cuarto de ciclo detrás de la primera onda sinusoidal. En una realización, el pulso de la primera corriente comprende un período de la primera onda sinusoidal y el pulso de la segunda corriente comprende un período de la segunda onda sinusoidal.

- 25 Un método para la excitación de neuronas puede comprender someter una neurona a un campo eléctrico giratorio, excitando de ese modo la neurona y recogiendo o detectando una señal eléctrica procedente de la neurona excitada. La recogida o detección de una señal eléctrica procedente de la neurona se puede realizar por electroencefalografía (EEG).

- 30 En una realización, el campo eléctrico giratorio se genera utilizando un conjunto de electrodos. En una realización, se aplica voltaje al conjunto de electrodos. En una realización, el voltaje varía con el tiempo. En una realización, el conjunto de electrodos está girando en el espacio.

En una realización, la excitación neuronal comprende excitación axonal.

- 35 El sistema se puede aplicar para diagnóstico. El sistema se puede aplicar para tratamiento. La excitación neuronal se puede aplicar a un cultivo de neuronas. Se puede detectar la respuesta de dicho cultivo a la excitación de las neuronas. La respuesta de un cultivo neuronal a la excitación de las neuronas se puede detectar por los cambios espectrales de imagen en el cultivo. La respuesta se puede detectar por fluorescencia.

El campo giratorio excita los axones de las neuronas, en donde la dirección del eje largo de un axón crea un ángulo distinto de cero con respecto a la dirección del eje largo de un segundo axón. El campo eléctrico giratorio excita al menos el número mínimo de neuronas necesarias para generar una respuesta en una población de neuronas, generando de este modo una respuesta eléctrica en la población de neuronas. En una realización, los ejes largos de los axones de al menos dos de las neuronas no son paralelos.

- 40

En una realización, esta invención proporciona un dispositivo para mejorar la excitación de las neuronas, comprendiendo dicho dispositivo un conjunto de al menos dos bobinas separadas. En una realización, las al menos dos bobinas separadas son accionadas con desplazamiento de fases de la corriente en el tiempo. En una realización, las bobinas crean al menos dos campos eléctricos dependientes del tiempo, cuya suma resultante cambia de orientación con el tiempo. En una realización, las dos bobinas son accionadas independientemente. En una realización, las dos bobinas son accionadas independientemente por dos fuentes de alimentación.

- 45

En una realización, las dos bobinas están en ángulo una con respecto a la otra. En una realización, las dos bobinas están en ángulo recto una con respecto a la otra y son perpendiculares entre sí.

- 50 En una realización, las corrientes pasadas a través de las al menos dos bobinas comprenden: una primera corriente que pasa a través de una primera bobina y una segunda corriente que pasa a través de una segunda bobina de tal modo que la primera corriente tiene una fase con respecto a la segunda corriente. En una realización, la fase de la primera corriente con respecto a la segunda corriente es una fase de 90 grados.

En una realización, la primera corriente es pulsada y la segunda corriente es pulsada. En una realización, el número de dichos pulsos de la primera corriente y de la segunda corriente es uno o es mayor que uno.

En una realización, el pulso de la primera corriente comprende una primera onda sinusoidal y el pulso de la segunda corriente comprende una segunda onda sinusoidal de tal modo que la segunda onda sinusoidal se queda un cuarto de ciclo detrás de la primera onda sinusoidal.

La excitación neuronal comprende excitación axonal. El sistema se puede aplicar para diagnóstico. El sistema se puede aplicar para tratamiento.

La excitación neuronal se puede aplicar a un cultivo de neuronas. Se puede detectar la respuesta del cultivo a la excitación de las neuronas.

El campo giratorio excita los axones de las neuronas, en donde la dirección del eje largo de un axón crea un ángulo distinto de cero con respecto a la dirección del eje largo de un segundo axón.

El campo eléctrico giratorio puede excitar al menos el número mínimo de neuronas necesario para generar una respuesta en una población de neuronas, generando de este modo una respuesta eléctrica en la población de neuronas.

En una realización, los ejes largos de los axones de al menos dos de dichas neuronas no son paralelos.

Definiciones

La excitación neuronal se puede realizar induciendo o cambiando un campo eléctrico en una neurona o en los alrededores de una neurona o partes de la neurona. En una realización, el campo eléctrico inducido o el cambio en el campo eléctrico sobre una membrana neuronal o sobre una pequeña zona o región de la membrana neuronal pueden causar la excitación de las neuronas. En una realización, un campo eléctrico giratorio es un campo eléctrico en donde la dirección del campo cambia o varía en el tiempo/espacio. En una realización, un campo eléctrico giratorio tiene una pluralidad de componentes de campo, y la dirección de cada uno gira en el espacio. En una realización, un campo eléctrico giratorio tiene una pluralidad de componentes de campo, y la dirección de cada uno gira en el espacio como una función del tiempo.

En una realización, un campo magnético giratorio tiene una pluralidad de componentes de campo, y la dirección de cada uno es fija y cuya amplitud cambia en el tiempo. En una realización, un campo magnético giratorio tiene una pluralidad de componentes de campo cuya dirección es fija y cuya amplitud varía en función del tiempo.

En una realización, un campo eléctrico dependiente del tiempo es un campo eléctrico en donde la magnitud y la dirección del campo varían con el tiempo. En una realización, una bobina es una bobina eléctricamente conductora.

En una realización, una bobina es un material, alambre o placa eléctricamente conductor, de una estructura circular, redondeada o similar a una espiral, a través del cual se puede hacer pasar una corriente eléctrica.

En una realización, dos bobinas en dispositivos de esta invención están conectadas independientemente a dos fuentes de alimentación de tal modo que cada fuente de alimentación funciona independientemente, y de tal modo que el voltaje/corriente son inducidos independientemente en cada bobina. En una realización, una fuente de alimentación con una pluralidad de salidas hace funcionar las al menos dos bobinas.

En una realización, una unidad de detección de señales eléctricas, una unidad de formación de imágenes o una combinación de las mismas comprende una unidad de Electroencefalografía (EEG), una unidad de formación de imágenes de resonancia magnética (MRI) o una combinación de las mismas.

En una realización, las dos bobinas son perpendiculares entre sí. En una realización, las dos bobinas están cerca de ser perpendiculares entre sí. En una realización, el ángulo entre los planos de las bobinas varía entre 80 grados y 100 grados.

En una realización, una fase de 90 grados de una corriente con respecto a otra corriente representa un cuarto de un período de retraso de una función periódica de la corriente de una corriente con respecto a una función periódica similar de otra corriente. Según esta realización, un período completo de una función de corriente se representa por 360 grados. En una realización, la fase de 90 grados representa un retraso de 1 cuarto de ciclo de dicha primera corriente detrás de la segunda corriente. En una realización, un ciclo es un período de una función periódica.

En una realización, la fórmula de forma de onda para un campo eléctrico giratorio inducido por dos campos magnéticos inducidos por dos bobinas se describe como sigue: una bobina comienza a descargar y 1/4 de ciclo más tarde, la segunda bobina comienza a descargar. El campo eléctrico resultante de la primera bobina es: $A \cdot \cos(2\pi \cdot t/T)$ donde T es el período del ciclo, y A es la amplitud. El campo resultante de la segunda bobina es: $A \cdot \cos(2\pi \cdot t/T - \pi/2)$. Si los dos campos eléctricos son perpendiculares entre sí, iguales en amplitud máxima y en tiempo de ciclo, entonces la suma resultante de dos campos realiza una rotación de 270 grados.

- La corriente pulsada es una corriente que se introduce a una bobina en pulsos. En una realización, durante un pulso, la corriente pasa a través de una bobina y en un intervalo entre pulsos, no pasa ninguna corriente o pasa una corriente muy mínima a través de las bobinas. En una realización, la corriente mínima que puede pasar a través de la bobina en un intervalo entre pulsos está por debajo del umbral necesario para producir un campo magnético efectivo. En una realización, la frecuencia de corriente es la frecuencia de la corriente alterna pasada a través de las bobinas de esta invención. En una realización, el patrón de onda es el patrón de la función de la corriente. En una realización, el patrón de onda es la función de la corriente frente al tiempo. En una realización, la amplitud de corriente, la amplitud de pico representa el valor de la corriente o el valor más alto de la corriente que pasa a través de las bobinas de esta invención. En una realización, el patrón de pulsos se define por el número de pulsos de corriente, el tiempo de cada pulso de corriente, el tiempo entre pulsos de corriente o una combinación de los mismos.
- En una realización, la forma de onda de la corriente es una onda sinusoidal. En una realización, la fase entre las dos corrientes pasadas en dos bobinas diferentes se puede representar por una onda sinusoidal para la primera corriente y por una onda cosenoidal para la segunda corriente.
- En una realización, un conjunto de electrodos comprende al menos dos electrodos. En una realización, al aplicar voltaje a los al menos dos electrodos, se genera un campo eléctrico en la zona entre los electrodos. En una realización, cambiando la posición de los electrodos, o aplicando voltaje a tres o más electrodos, se puede generar un campo eléctrico giratorio en la zona entre los electrodos o en partes de la zona entre los electrodos.
- En una realización, el voltaje es voltaje eléctrico. En una realización, el término capacitancia es el término utilizado en electromagnetismo y en electrónica. En una realización, la capacitancia es la capacidad de un cuerpo para mantener una carga eléctrica.
- En una realización, alta capacitancia es cualquier valor de capacitancia en el intervalo de 50-400 μF para el campo de excitación axonal o cualquier valor de capacitancia mayor que 1 mF para la excitación dendrítica.
- En una realización, las dendritas son las proyecciones ramificadas de una neurona que actúan para conducir la estimulación electroquímica recibida desde otras células neurales hasta el cuerpo celular, o soma, de la neurona desde la cual se proyectan las dendritas. La estimulación eléctrica es transmitida a las dendritas por las neuronas aguas arriba a través de las sinapsis que se encuentran en diversos puntos a lo largo del árbol dendrítico. Las dendritas desempeñan un papel crítico en la integración de estas entradas sinápticas y en la determinación del grado en que son producidos potenciales de acción por la neurona. En una realización, un axón es una proyección larga y delgada de una célula nerviosa o neurona que conduce impulsos eléctricos lejos del cuerpo o soma celular de la neurona.
- En una realización, una neurita se refiere a cualquier proyección desde el cuerpo celular de una neurona. Esta proyección puede ser un axón o una dendrita. En una realización, el potencial de acción es una onda autorregeneradora de actividad electroquímica que permite a las células nerviosas llevar una señal a lo largo de una distancia. En una realización, el potencial de acción es la señal eléctrica primaria generada por las células nerviosas, y surge de los cambios en la permeabilidad de las membranas axonales de las células nerviosas para iones específicos. En una realización, los potenciales de acción (conocidos también como impulsos o espigas nerviosas) son ondas de voltaje de tipo pulso que viajan a lo largo de varios tipos de membranas celulares. En una realización, el encendido de una neurona, una neurona que se enciende o el término "encender", "encendiendo" o "encendido" significa el suceso de un potencial de acción que ocurre en la mencionada neurona.
- Dimensiones y valores
- En una realización, los siguientes parámetros determinan la amplitud del pulso magnético y el tiempo del ciclo: carga de voltaje en el condensador, inductancia L de la bobina y capacitancia C del condensador.
- En una realización, la carga de voltaje V en el condensador varía entre 0 V y 5 kV. En una realización, la carga de voltaje V en el condensador puede estar hecha para cargar hasta 20 kV. En una realización, la inductancia L de la bobina varía entre 0 μH y 50 μH . En una realización, la inductancia L de la bobina varía entre 1 μH y 50 μH . En una realización, la capacitancia del condensador es 109 μF . En una realización, para la excitación dendrítica, la capacitancia del condensador es 1 mF. En una realización, para la excitación dendrítica, la capacitancia del condensador es de 5 mF. En una realización, la capacitancia del condensador varía entre 1 mF y 5 mF.
- En una realización, los tiempos de ciclo (o anchura de pulso) resultantes de estos parámetros varían entre 100 μs y 5 ms.
- En una realización, los estimuladores comprenden fuentes de voltaje, condensadores y bobinas con los siguientes parámetros: V = 0-5 kV, L = 10-50 μH , C = 109 μF y los tiempos de ciclo resultantes son de 200 μs - 500 μs .
- En una realización, los estimuladores que comprenden las bobinas se pueden usar para TMS única o para TMS múltiple con velocidades de estimulación de hasta 100 Hz. La orientación de las bobinas se puede cambiar con respecto a la placa (de cultivo), sujeto animal o humano.

En una realización, la intensidad del campo eléctrico utilizada para excitar una neurona o un conjunto de neuronas varía entre 50-500 V/m. En una realización, la intensidad del campo eléctrico utilizada es al menos 100 V/m.

En una realización, la intensidad del campo magnético utilizada para generar el primer campo eléctrico giratorio varía entre 0,1-5 T. En una realización, la intensidad del campo eléctrico utilizada es al menos 100 V/m.

- 5 En una realización, la corriente que pasa a través de las bobinas varía entre 1 kA-10 kA. En una realización, la corriente que pasa a través de las bobinas es de al menos 1 kA.

- 10 En una realización, la corriente que pasa a través de una primera bobina y la corriente que pasa a través de una segunda bobina tienen una fase de 90 grados una con respecto a la otra. En otra realización, la fase de corriente varía entre 85 y 95 grados. En otra realización, la fase de corriente varía entre 1 y 90 grados. En una realización, la fase de corriente varía entre 90 y 180 grados. En una realización, la fase de corriente varía entre 180 y 270 grados. En una realización, la fase de corriente varía entre 270 y 359 grados. En una realización, la fase de corriente es cualquier número de grados distinto de cero grados. En una realización, las fases de corriente en grados se refieren a corrientes que presentan cierta función periódica de la corriente frente al tiempo. En una realización, la función periódica de la corriente frente al tiempo está representada por una onda sinusoidal. En una realización, cualquier otra combinación de función de fase y de forma de onda puede ser útil para crear un campo giratorio que no sea circular (por ejemplo, de forma elíptica o de cualquier forma arbitraria casi circular que pueda ser ventajosa para un caso específico de neuronas).

- 20 En una realización, la fase de 90 grados representa un retraso de 1 cuarto de ciclo de dicha primera corriente detrás de dicha segunda corriente. En una realización, el retraso de ciclo varía entre 0,20 de un ciclo y 0,30 de un ciclo. En una realización, el retraso de ciclo varía entre 0,01 de un ciclo y 0,50 de un ciclo. En una realización, el retraso de ciclo varía entre 0,50 de un ciclo y 0,99 de un ciclo. En una realización, el retraso de ciclo se refiere al retraso de una corriente detrás de otra corriente en donde ambas corrientes presentan una cierta función periódica de la corriente frente al tiempo. En una realización, la función periódica de la corriente frente al tiempo está representada por una onda sinusoidal.

- 25 En una realización, solamente se usa un pulso de dos corrientes en dos bobinas. En otra realización, se usa más de un pulso. En una realización, los pulsos de corriente en las al menos dos bobinas son de la misma frecuencia de pulso. En otra realización, los pulsos de corriente en las al menos dos bobinas son de una frecuencia de pulsos diferente. En una realización, la frecuencia de pulso es 1 Hz. En una realización, la frecuencia de pulsos es 50 Hz. En una realización, la frecuencia de pulsos varía entre 1 Hz y 50 Hz. En una realización, la frecuencia de pulsos varía entre 1 Hz y 100 Hz.

- 30 En una realización, los pulsos de la primera corriente y los pulsos de la segunda corriente son del mismo patrón de onda. En una realización, los pulsos son de un patrón de onda diferente. En una realización, cualquier combinación de formas de onda de pulsos puede ser útil para crear un campo giratorio que no sea circular (por ejemplo, elíptico o de cualquier forma arbitraria casi circular que pueda ser ventajosa para un caso específico de neuronas).

- 35 En una realización, la amplitud del pico de corriente varía entre 1 kA-10 kA.

En una realización, el número de pulsos utilizados para un suceso de estimulación específica es uno. En una realización, el número de pulsos utilizados para un suceso de estimulación específica varía entre 1 y 50. En una realización, el número de pulsos utilizados para un suceso de estimulación específica varía entre 1 y 100. En una realización, el número de pulsos utilizados para un suceso de estimulación específica varía entre 100 y 1000.

- 40 En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 1 microsegundo y 100 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 10 microsegundos y 100 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 50 microsegundos y 100 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 100 microsegundos y 200 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 100 microsegundos y 1000 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 100 microsegundos y 500 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 100 microsegundos y 2000 microsegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 1 milisegundo y 10 milisegundos. En una realización, el tiempo de cada pulso varía entre 1 milisegundo y 5 milisegundos.

- 50 En una realización, el tiempo entre pulsos es aproximadamente 20 milisegundos. En una realización, el tiempo entre pulsos varía entre 10 milisegundos y 30 milisegundos. En una realización, el tiempo entre pulsos es 1 milisegundo. En una realización, el tiempo entre pulsos varía entre 1 milisegundo y 10 milisegundos. En una realización, el tiempo entre pulsos varía entre 10 milisegundos y 100 milisegundos. En una realización, el tiempo entre pulsos varía entre 100 μ S y 30 segundos. En una realización, el tiempo entre pulsos es del orden de segundos. En una realización, el tiempo entre pulsos es del orden de milisegundos. En una realización, el tiempo entre pulsos es del orden de microsegundos.

- 55 En una realización, un pulso de corriente que pasa a través de una bobina comprende un período de una onda sinusoidal y el segundo pulso de corriente que pasa a través de una segunda bobina comprende un período de una onda cosenoidal. En una realización, los pulsos de corriente comprenden medio período de una onda sinusoidal. En

- una realización, los pulsos de corriente comprenden un cuarto de un período de una onda sinusoidal. En una realización, los pulsos de corriente comprenden tres cuartos de un período de una onda sinusoidal. En una realización, el pulso de corriente comprende dos periodos de la onda sinusoidal. En una realización, los pulsos de corriente comprenden entre 1 y 10 periodos de la onda sinusoidal. En una realización, los pulsos de corriente comprenden entre 0,01 y 0,99 de un período de una onda sinusoidal.
- 5 En una realización, el voltaje aplicado al conjunto de electrodos varía entre 1 y 36 V pico a pico. En una realización, el pulso es un pulso cuadrado bipolar. En una realización, la anchura de pulso varía entre 0,1 y diez milisegundos.
- En una realización, el voltaje aplicado a ciertos electrodos en un conjunto de electrodos varía con el tiempo. En una realización, la variación de voltaje en el tiempo es diferente a lo largo de diferentes direcciones o a lo largo de diferentes ejes, de tal modo que la región o regiones entre los electrodos a los que se aplica el voltaje experimentan variaciones en el campo eléctrico.
- 10 En una realización, el conjunto de electrodos gira en el espacio. En una realización, el conjunto de electrodos o parte del mismo gira 90 grados. En una realización, el conjunto de electrodos es capaz de girar 180 grados. En una realización, el conjunto de electrodos es capaz de girar 360 grados o menos.
- 15 En una realización, la duración del pulso del campo eléctrico es igual o mayor que 1 ms de duración. En una realización, la duración del pulso o el tiempo de subida varía entre 100 μ S y 1000 μ S. En una realización, la duración del pulso o el tiempo de subida varía entre 750 μ S y 1250 μ S. En una realización, la duración del pulso o el tiempo de subida varía entre 1 ms y 10 ms. En una realización, la duración del pulso o el tiempo de subida varía entre 0,5 ms y 2 ms. En una realización, la duración del pulso o el tiempo de subida varía entre 0,9 ms y 100 ms.
- 20 En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina es al menos 0,1 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina es al menos 1,0 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina es al menos 4,8 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina es al menos 1,0 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina es al menos 0,05 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina varía entre 0,1 mF y 10 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina varía entre 1 mF y 5 mF. En una realización, la capacitancia del condensador conectado a la bobina varía entre 10 mF y 50 mF.
- 25 En una realización, el número de vueltas de la bobina varía entre 20 y 80 vueltas. En una realización, el número de vueltas de la bobina varía entre 10 y 50 vueltas. En una realización, el número de vueltas de la bobina varía entre 10 y 100 vueltas. En una realización, el número de vueltas de la bobina varía entre 40 y 100 vueltas.
- 30 En una realización, la inductancia L de la bobina varía entre uno y 50 μ H. En una realización, la inductancia L de la bobina varía entre uno y 10 μ H. En una realización, la inductancia L de la bobina varía entre 25 y 50 μ H.
- En una realización, el diámetro interno/externo de la bobina es de 100 mm. En una realización, el diámetro interno/externo de la bobina es de 10 mm. En una realización, el diámetro interno/externo de la bobina varía entre 5 mm y 200 mm. En una realización, el diámetro interno/externo de la bobina varía entre 10 mm y 50 mm. En una realización, el diámetro interno/externo de la bobina varía entre 50 mm y 100 mm. En una realización, el diámetro interno/externo de la bobina varía entre 100 mm y 200 mm.
- 35 En una realización, la bobina está hecha de un material conductor. En una realización, la bobina está hecha de metal. En una realización, la bobina está hecha de cobre. En una realización, la bobina está hecha de alambre de cobre aislado. En una realización, el espesor del alambre de cobre es de 0,254 mm (0,01 in) y 6,35 mm (0,25 in) de ancho. En una realización, el espesor, anchura o diámetro del alambre de la bobina varía entre 0,127 mm (0,005 in) y 12,7 mm (0,50 in).
- 40 En una realización, el estimulador comprende un condensador de 4,8 mF y una carga de voltaje máxima de 6,5 kV. En una realización, el estimulador comprende un condensador de 0,1 mF y una carga de voltaje máxima de 22 kV.
- En una realización, los campos magnéticos generados varían entre 0 y 1 tesla. En una realización, los campos magnéticos generados varían entre 1 y 10 teslas. En una realización, los campos magnéticos generados varían entre 0,5 y 1,5 teslas. En una realización, los campos magnéticos generados por los métodos de esta invención varían entre 0,2 y 3 teslas.
- 45 En una realización, el umbral de estimulación del campo eléctrico utilizado varía entre 200 V/m y 1000 V/m para cultivos excitados por un campo eléctrico giratorio inducido por dos bobinas. En una realización, el campo eléctrico generado por una configuración de dos bobinas varía entre 1 V/m y 200 V/m. En una realización, el umbral de estimulación del potencial varía entre 1 y 20 V/m para cultivos excitados por un conjunto de electrodos.
- 50 En una realización, la unidad ms significa milisegundos. En una realización, μ s significa microsegundos. En una realización, mF significa milifaradios. En una realización, μ H significa microHenrio. En una realización, todas las unidades que describen parámetros físicos son las unidades convencionales utilizadas y reconocidas por cualquier experto en la técnica.
- 55

Geometrías y orientaciones

- En una realización, la bobina es esférica. En una realización, la bobina tiene una figura en forma de 8. En una realización, la bobina tiene forma de hoja de trébol. En una realización, la bobina tiene forma de mariposa. En una realización, se emplean dos bobinas. En una realización, se emplean tres o cuatro bobinas. En una realización, se usan cinco o seis bobinas. En una realización, el número de bobinas varía entre dos y diez bobinas. En una realización, el número de bobinas varía entre tres y cinco bobinas. En una realización, el número de bobinas varía entre seis y 20 bobinas. En una realización, cada plano de la bobina es perpendicular a todos los demás planos de bobina. En una realización, todos los planos de la bobina se encuentran en el mismo plano. En una realización, hay un ángulo distinto de 90 grados entre los planos de al menos dos bobinas. En una realización, se puede usar una multitud de protocolos para extender los campos giratorios. Cualquier combinación de dos sistemas de bobina separados se puede hacer para crear alguna variación de un campo eléctrico giratorio, por ejemplo, una rotación elíptica en lugar de una circular perfecta. La amplitud de ambas bobinas no es necesario que sea la misma, y tampoco lo es el tiempo de ciclo ni la orientación relativa entre las dos bobinas.

Materiales

- En una realización, la bobina es un alambre hecho de metal. En una realización, el metal es cobre. En una realización, el volumen interno de la bobina está lleno con un material magnético. En una realización, el volumen interno de la bobina está lleno de hierro. En una realización, el alambre conductor de la bobina está aislado. En una realización, la bobina comprende vueltas. En una realización, los electrodos están hechos de metal. En una realización, el metal comprende platino, oro o paladio. En una realización, los electrodos están hechos de plata. En una realización, la bobina está rodeada por un sistema de enfriamiento. En una realización, el sistema de enfriamiento evita que la bobina se sobrecaliente mientras está en funcionamiento.

Métodos

- En una realización, esta invención proporciona una excitación de alta eficiencia de los axones, provocando así que se encienda una neurona. Esto se logra escaneando todas o la mayoría de las direcciones de la población de axones deseada (los axones son direccionales) con un campo eléctrico. En una realización, esto se logra creando un campo eléctrico giratorio que escanea todas estas direcciones y puede excitar a los axones independientemente de su direccionalidad. Esto implica un dispositivo que tiene dos bobinas configuradas en un ángulo (por ejemplo, perpendicular) una de otra, cada una conectada por separado a una fuente diferente de corriente/potencia, las dos bobinas accionadas con un desplazamiento de fase en el tiempo una con respecto a la otra. El desplazamiento de fase hace que el campo eléctrico escanee a lo largo del tiempo, diferentes direcciones en el espacio.

- Algunas realizaciones de esta invención se usan *in vitro*. Algunas realizaciones de esta invención se usan en cultivos celulares. Algunas realizaciones de esta invención se usan en cultivos celulares bidimensionales. Algunas realizaciones de esta invención se usan en cultivos celulares tridimensionales. Algunas realizaciones de esta invención se usan en cultivos de células muy pequeñas. En una realización, al menos una dimensión que describe el tamaño del cultivo celular varía entre 1 y 20 micrómetros. En una realización, cuando se aplica un campo giratorio a un cultivo en placa, el tamaño de la placa, el tamaño del cubreobjetos sobre el que se cultiva/deposita el cultivo y los métodos de modelado del cubreobjetos de cultivo se ajustan para fijar los estimuladores y los parámetros estimuladores para lograr la excitación neuronal de las neuronas del cultivo.

- En una realización, esta invención proporciona una herramienta de TMS que realiza la TMS. En una realización, se diseña un aparato de tal modo que el aparato o elementos del aparato puedan realizar la TMS. En una realización, esta invención proporciona un kit que comprende una herramienta de TMS.

- Ciertos elementos de los métodos para hacer funcionar los dispositivos de esta invención se realizan automáticamente. En una realización, elementos de los métodos para hacer funcionar los dispositivos de esta invención son realizados por un robot. En una realización, los sistemas de esta invención están diseñados para uso doméstico por un sujeto.

- En una realización, los dispositivos de esta invención comprenden además bases, soportes y/u otros accesorios para sostener las bobinas en las posiciones deseadas con respecto al cultivo que se está probando. Las bobinas, los electrodos, los dispositivos, herramientas, aparatos o sistemas pueden comprender además partes móviles para ayudar a colocar las bobinas o los electrodos con respecto a la zona bajo examen o la zona tratada. En una realización, las partes móviles están controladas por un sistema computarizado.

- En una realización, los dispositivos de esta invención comprenden además medios para recoger o detectar señales procedentes de las neuronas. En una realización, la detección o recogida de una señal se hace por EEG y/o MRI. En una realización, la detección o recogida de una señal se realiza por retroalimentación motora, es decir, la activación de los músculos registrando con EMG u observando el movimiento. En una realización, la detección o recogida de una señal se realiza por retroalimentación.

En una realización, la detección o recogida de una señal *in vitro* se realiza mediante electrofisiología (electrodos) o mediante imágenes ópticas de actividad - imágenes de calcio, formación de imágenes con colorantes sensibles al voltaje, etc.

5 En una realización, las herramientas de esta invención se usan para diagnosticar y/o para tratar enfermedades y afecciones neurológicas. En otra realización, las herramientas de esta invención se usan para diagnosticar el riesgo de adquirir una afección o trastorno neurológico. En otra realización, los métodos y herramientas de esta invención se usan para tratar sujetos que tienen un riesgo de adquirir una afección o trastorno neurológico.

10 En una realización, las afecciones tratadas y/o diagnosticadas comprenden enfermedades o trastornos cognitivos. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno cognitivo comprende pérdida de memoria, trastorno de aprendizaje, enfermedad de Alzheimer, demencia multiinfarto, que incluye la variante de la enfermedad de Alzheimer con cuerpos de Lewy, demencia multiinfarto, enfermedad de Parkinson; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, trastorno de Korsakow, isquemia, ictus, traumatismo craneoencefálico, hipoglucemia, intoxicación por monóxido de carbono, intoxicación por litio, deficiencia de vitaminas (B1, tiamina y B12), trastorno depresivo, después de terapia electroconvulsiva (TEC) u otros como será apreciado por los expertos en la técnica.

15 Algunas realizaciones se pueden utilizar para diagnosticar un trastorno cognitivo leve o afecciones neuropsiquiátricas, enfermedades o trastornos cognitivos más graves, para distinguir entre ellos, o en algunas realizaciones, para indicar una probabilidad o un momento de evolución del primero al último.

20 En una realización, el trastorno cognitivo leve puede comprender, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (MCI) (que en la presente memoria incluye alteraciones cognitivas que van de mínimas a leves), pérdida leve de memoria, deterioro de la memoria asociado a la edad (AAMI), declive cognitivo asociado a la edad (ARCD), olvido benigno de la senescencia (BSF) o deterioro cognitivo sin demencia (CIND). Un trastorno cognitivo leve incluye los trastornos que requieren el deterioro cognitivo como una característica clínica del síndrome y los sujetos no cumplen los criterios de diagnóstico para la demencia, por ejemplo, los criterios del DSM-IV TR para la demencia. Entre estos trastornos, el deterioro cognitivo leve es una condición caracterizada por déficits cognitivos, más comúnmente de memoria, en ausencia de deterioro funcional clínicamente significativo. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para predecir si un sujeto que tiene deterioro cognitivo leve es probable que desarrolle la enfermedad de Alzheimer.

25 Las realizaciones de esta invención se pueden usar junto con ensayos clínicos adicionales y/o con evaluación clínica o métodos y herramientas de tratamiento adicionales. Dicha combinación de métodos se puede usar para evaluar, diagnosticar o determinar una afección neurológica en un sujeto. Tal combinación de métodos y herramientas se puede usar para evaluar o determinar la probabilidad o el riesgo relativo que tiene un sujeto para desarrollar una afección neuropsiquiátrica, una enfermedad o trastorno cognitivo. Tal combinación de métodos o herramientas se puede usar para el tratamiento de un sujeto que tiene o padece un trastorno tal como cualquiera de los trastornos enumerados en la presente memoria anteriormente y más adelante. Dicha combinación de métodos o herramientas se puede usar para el tratamiento de un sujeto que tiene un riesgo relativo de desarrollar una afección neuropsiquiátrica, enfermedad o trastorno cognitivo tal como cualquiera de los trastornos enumerados en la presente memoria anteriormente y más adelante.

30 Tales pruebas clínicas o métodos de evaluación adicionales son, pero no se limitan a pruebas neuropsicológicas de memoria y otras capacidades cognitivas, pruebas de capacidad para realizar actividades funcionales diarias, pruebas de imágenes cerebrales (incluyendo resonancia magnética de imagen (MRI), SPECT (tomografía computarizada por emisión de fotón único), y PET (tomografía por emisión de positrones)) y pruebas de biomarcadores en sangre, líquido cefalorraquídeo y otros fluidos y tejidos corporales, EEG, pruebas lingüísticas, pruebas de respuestas del sistema sensorial para respuestas de la visión, la audición, la sensación somática (tacto), el gusto y el olfato (olfato). Pruebas de habilidades motoras gruesas y finas, etc. En una realización, los métodos de formación de imágenes implican la detección de fluoróforos. En una realización, los fluoróforos u otros biomarcadores se administran al sujeto o a un cultivo celular antes o en paralelo a la realización de TMS en el sujeto. En una realización, la administración de un fluoróforo u otro biomarcador a un sujeto es una administración oral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intracraneal, intranasal, subcutánea, parenteral, transmucosal, transdérmica o tópica. En una realización, se miden el pulso, la frecuencia cardíaca y la temperatura de un sujeto junto con los métodos de estimulación magnética descritos en esta memoria.

35 En una realización, se administran fármacos antes o en combinación con la realización de la TMS de esta invención sobre un cultivo.

40 Los sistemas de TMS descritos en esta memoria se pueden usar junto con los métodos de TMS tradicionales. Los métodos de TMS descritos en la presente memoria se pueden usar antes, en paralelo o posteriormente a los métodos de TMS convencionales.

45 Las afecciones neuropsiquiátricas, enfermedades o trastornos cognitivos que se pueden determinar y/o tratar incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, síndrome amnésico de Korsakoff, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), esclerosis amiotrófica lateral,

enfermedad de la neurona motora, depresión, esquizofrenia, anorexia avanzada, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewy y/o demencia vascular.

En una realización, las herramientas de esta invención proporcionan diagnóstico y tratamiento para afecciones neurológicas o trastornos neurológicos tales como síndrome de Asperger, autismo, raquialgia, absceso cerebral, daño cerebral, lesión cerebral, tumor cerebral, dolor crónico, síndrome de dolor regional crónico, trastornos de trauma acumulativo, demencia, epilepsia, lesión craneal, cefalea, trastorno de motricidad, distrofia muscular, manifestaciones neurológicas del SIDA, estado vegetativo persistente, síndrome de piernas inquietas o lesión de la médula espinal.

En una realización, las herramientas de esta invención se pueden usar en el diagnóstico, tratamiento y como parte de un enfoque terapéutico o clínico para cualquier trastorno neurológico, trastorno psiquiátrico o enfermedades y afecciones relacionadas.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para estimular cultivos celulares tales como cultivo primario de neuronas de hipocampo, corticales, de DRG o cualquier otro cultivo de neuronas conectadas.

En una realización, esta invención proporciona excitación axonal. En una realización, esta invención proporciona excitación dendrítica. En una realización, esta invención proporciona excitaciones tanto axonales como dendríticas. En una realización, la excitación axonal o dendrítica o una combinación de las mismas se puede realizar utilizando estimulación eléctrica.

En una realización, esta invención proporciona estimulación de campo giratorio en cultivo 1D. En una realización, esta invención proporciona estimulación de campo giratorio en cultivos 2D. En una realización, esta invención proporciona estimulación de campo giratorio en humanos. En una realización, esta invención proporciona estimulación de campo giratorio en animales. En una realización, esta invención proporciona estimulación de campo giratorio en ratas.

Parámetros tales como los campos y la configuración magnética utilizados, por ejemplo, en el diseño de hoja de trébol descrito en la presente memoria se pueden elegir de tal modo que los dispositivos de esta invención se puedan usar clínicamente.

La capacidad para estimular magnéticamente cultivos 2D es importante, particularmente en vista de la dificultad descrita de conseguir esto utilizando la bobina planar estándar simple o de forma de ocho (Rotem, A. and Moses E. Magnetic Stimulation of One-dimensional Neuronal Cultures, Biophys. J. 2008 Jun; 94 (12): 5065-78). Esta capacidad puede ser un resultado directo de la rotación del campo y resalta dos hechos: 1) los axones son el dominio neuronal que se excita durante la TMS y 2) los axones no tienen una orientación preferida en los cultivos 2D.

Sorprendentemente, 4 de 15 cultivos que podrían ser excitados por la bobina cruzada en una realización, también fueron excitados por una sola bobina del par. Esto se atribuye al hecho de que los cultivos que respondieron a la bobina única tenían por casualidad varios axones en el cultivo dirigidos en la orientación correcta y pudieron ser excitados por el campo eléctrico inducido. Puesto que el campo de una bobina está orientado espacialmente, no es sorprendente que la excitación de los cultivos fuera dependiente de la dirección y pudiera ser abolida girando el cultivo 45° con respecto a la bobina.

El campo giratorio hace más que sólo encontrar la orientación correcta y excitar los axones que se encuentran en esa dirección. La probabilidad de que tal orientación exista, es decir, que varios axones en el cultivo estén orientados a lo largo de un único eje, es presumiblemente baja. En todos los demás casos, la orientación del axón se distribuye aleatoriamente, y es la capacidad de barrido de la bobina cruzada la que hace posible la excitación de esos cultivos.

Un tema de gran interés obvio es la aplicación de la geometría de la bobina cruzada a sujetos humanos. Es posible fabricar bobinas suficientemente grandes para que la cabeza humana se pueda colocar totalmente dentro de las bobinas cruzadas. El campo inducido girará entonces en el espacio alrededor del eje que conecta los dos polos del sistema y se espera que sea más fuerte justo por los polos. También se inducirá un campo no giratorio de similar intensidad a lo largo de la circunferencia de cada bobina separada. Como consecuencia, esta configuración sufrirá la desventaja de excitar muchas regiones, tanto zonas musculares como cerebrales que no son objetivos. Una simulación que demuestra esto se presenta más adelante en esta memoria.

Un tipo diferente de implementación de la rTMS para la cabeza humana es el diseño de hoja de trébol (véase Métodos y materiales), que alcanza una capacidad de campo de barrido enfocado, aunque se utiliza el equivalente de la bien conocida bobina de forma de ocho. Se espera que esta configuración sea más agradable para uso clínico que la bobina cruzada. El uso de la rTMS en sujetos humanos eventualmente hará posible la excitación de regiones corticales actualmente inaccesibles, cuya orientación axonal aleatoria no es susceptible de excitación con un campo de dirección fija, no giratorio.

Otra ventaja obvia de la rTMS consiste en eliminar la necesidad de un posicionamiento y una orientación precisos y mantenidos de la bobina, lo que siempre requiere mucho tiempo y a menudo necesita un equipo estereotáctico engorroso o costoso. Por supuesto, hay ventajas para la orientación única del campo eléctrico inducido que ofrecen las bobinas estándar individuales o de forma de ocho, por ejemplo, la alta especificidad que se puede lograr cuando se conoce la anatomía de la región objetivo.

Se debe enfatizar que la rTMS como tecnología es de naturaleza complementaria, y se puede usar junto con la mayoría de los otros avances de la tecnología, por ejemplo, la TMS profunda o nuevos protocolos de frecuencia repetitiva. La fuente de alimentación adicional y los imanes dobles representan una carga técnica o financiera mínima, comparable a la incurrida en una configuración de pulsos emparejados, cuyas ventajas superan fácilmente al costo.

La sensibilidad a la orientación de campo tiene su origen en la direccionalidad de los axones, y en el hecho de que la estimulación magnética se alcanza a través de la excitación axonal. Si la neurona se pudiera excitar en las dendritas, entonces la dependencia de la orientación del campo desaparecería (como en la rTMS) ya que el árbol dendrítico es isótropo. Debido a sus diferentes propiedades físicas, la excitación de las dendritas necesita la aplicación de pulsos de mayor duración, pero actualmente solo se puede acceder a ellos mediante excitación eléctrica como se describe aquí más adelante. Lograr pulsos largos en una estimulación magnética es factible, y actualmente se está llevando a cabo en el laboratorio de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estimuladores magnéticos para campos giratorios

Se indujo un campo eléctrico giratorio utilizando dos conjuntos independientes de bobinas cuyos campos magnéticos son perpendiculares entre sí y cuyas corrientes tienen un desplazamiento de fase una de la otra de un cuarto de ciclo. Introduciendo un retraso de fase de 90° entre los dos pulsos magnéticos sinusoidales se logró activando con precisión dos fuentes de alimentación independientes, que cada una de ellas controle una bobina separada en forma de ocho.

Fuentes de alimentación. Las dos fuentes de alimentación utilizadas fueron Magstim Rapid TMS (Magstim, UK) y un estimulador doméstico (HMS). El HMS se basa en un condensador grande de 0,1 mF (Maxwell Laboratories, USA) con una carga máxima de voltaje de 22 kV y es capaz de obtener campos magnéticos que son cinco veces más fuertes que el campo suministrado en la muestra por el Magstim Rapid disponible comercialmente. Para lograr un retraso de fase exacto entre los dos pulsos magnéticos, las dos fuentes de alimentación se sincronizaron utilizando un generador de señales (Keithley 3390 50 MHz Arbitrary Waveform/Function Generator, Keithley instruments, USA). El generador de señales emitió dos señales de disparo separadas por 1/4 de ciclo. Este retraso cambió según las bobinas utilizadas y varió entre 50-150 µs.

Bobinas magnéticas. Las bobinas magnéticas se fabricaron en el laboratorio, utilizando un alambre de cobre rectangular recubierto de poliéster de 0,254 mm (0,01 in) de grosor y 6,35 mm (0,25 in) de ancho (MWS Wire Industries, USA). Los alambres se envolvieron alrededor de marcos hechos a medida. Las vueltas de alambre se aislaron con fibras de vidrio y se moldearon en epoxi (1 parte de Versamid 140 en 2 partes de EPDN 814). Para la configuración de las bobinas cruzadas (véase más adelante) se usaron 10 y 11 vueltas con diámetros internos de 75 y 62 mm, respectivamente. Para la configuración de hoja de trébol (véase más adelante) se utilizó un diámetro interno de 20 mm. Se conectó un par de bobinas de 25 vueltas a la fuente de alimentación Magstim y se conectó un par de bobinas de 30 vueltas al estimulador doméstico.

Bobinas de hoja de trébol. Una de tales configuraciones posibles, que se muestra en la Figura 3, emplea dos bobinas estándar en forma de ocho. El campo eléctrico inducido justo por encima del centro de cada bobina en forma de ocho se dirige perpendicularmente al eje que conecta los dos centros de las bobinas, de modo que las dos bobinas en forma de ocho crean campos que son perpendiculares entre sí. Al descargar conjuntamente ambas bobinas en forma de ocho se generará un vector resultante que es la suma de los dos campos. Al descargar la segunda bobina en forma de ocho un cuarto de ciclo después del inicio de la primera, se produce un campo eléctrico giratorio en el centro del sistema. Introduciendo un retraso de fase de 90° entre los dos pulsos magnéticos sinusoidales se logra activando con precisión dos fuentes de alimentación independientes, que cada una de ellas controle una bobina separada en forma de ocho.

Bobinas cruzadas. Una segunda configuración se muestra en la Figura 3, e incluye dos bobinas cuyos planos son perpendiculares. Cerca de los polos, donde se cruzan las dos bobinas, el campo eléctrico es grande y está dirigido tangencialmente en el plano de la bobina. Como en el diseño de hoja de trébol, cada una de las bobinas está conectada a una fuente de alimentación separada y uno de los pulsos magnéticos sinusoidales tiene un desplazamiento de fase de 90° con respecto al otro. Para las bobinas cruzadas (véase la figura 1) se utilizaron dos bobinas circulares con 10 y 11 vueltas y diámetros internos de 75 y 62 mm respectivamente. Las dos bobinas se colocaron una dentro de la otra, a la vez que mantenían sus planos perpendiculares. El punto de acceso de la bobina cruzada está ubicado cerca de los polos de la construcción, donde las dos bobinas se cruzan (Figura 1d-f) y

los campos inducidos de las bobinas son perpendiculares entre sí. Esta configuración es más simple que la bobina de hoja de trébol (véase más adelante), y no sufre pérdidas de inducción mutuas, ya que los planos de las dos bobinas son perpendiculares.

Medida del campo eléctrico inducido y calibración de las bobinas.

- 5 Para medir el campo eléctrico inducido de las bobinas, se utilizó una bobina de captación de 40 mm de diámetro. La bobina de captación se colocó dentro de la bobina medida, paralela a su plano. Las medidas no fueron sensibles a si la bobina de captación era o no concéntrica con la bobina magnética. La bobina de captación se utilizó para calibrar la bobina cruzada como sigue: en primer lugar, se midió la relación entre el ajuste de potencia del estimulador y el campo inducido resultante de cada una de las bobinas y se encontró una relación lineal para cada par de estimulador y bobina circular. En segundo lugar, se comparó la constante de proporcionalidad de la bobina doméstica (HMS) frente a la bobina Magstim y se encontró que el campo inducido al 100 % de ajuste de potencia de la Magstim es equivalente al ajuste de 3 kV de la HMS. Esto determina la intensidad máxima de un pulso de campo giratorio, que para la bobina cruzada era igual a 345 ± 25 V/m en el punto de acceso del plano del cubreobjetos. Esta equivalencia se utilizó durante el experimento, manteniendo la relación de 3 kV/100 % para cualquier ajuste de la intensidad del pulso. Por ejemplo, cuando se administra un pulso que es la mitad de la intensidad máxima, se usaron 50 % de potencia de la Magstim y 1,5 kV de carga de la HMS, mientras que para un pulso que es 3/4 de la intensidad máxima se usaron 75 % de potencia de la Magstim y 2,25 kV de carga de la HMS.

- 20 Estimación del campo eléctrico inducido en el punto de acceso. Para estimar el campo eléctrico inducido en la ubicación de las células nerviosas, se consideraron las dimensiones del medio conductor localizado dentro de la bobina. Puesto que cualquier campo eléctrico inducido fuera del medio conductor es cancelado en la interfaz por las cargas superficiales, la escala de longitud relevante para calcular el campo eléctrico que resulta de un campo magnético uniforme es la de la sección transversal de medios conductores paralelos al plano de la bobina. En el caso de la estimulación de cultivo 2D, esto se tomó como la dimensión de la bola esférica (5 cm de diámetro, debido a la base aplanada de la esfera y al residuo de aire en la parte superior de la esfera). En el caso de TMS en ratas, esto se tomó como la distancia de oreja a oreja de cada rata (entre 3-4 cm de diámetro).

Simulación del campo eléctrico inducido para la configuración de la bobina de hoja de trébol

Cálculo del campo eléctrico inducido para simulaciones

- 30 El campo eléctrico, producido por la bobina de hoja de trébol, se calculó por cálculo numérico. Para este fin, la forma del devanado de la bobina se describió por splines polinomiales de tercer orden en x e y y después se discretizó a los vectores de segmento recto l_i de 1 milímetro de longitud. Para tener en cuenta la altura del alambre, se consideraron 6 casos de bobina, cada una desplazada 1 mm en z, cada una conduciendo 1/6 de la corriente total. Cada uno de los segmentos contribuyó al potencial del vector magnético A de acuerdo con:

$$\mathbf{A}(\mathbf{r}, t) = \frac{\mu_0}{4\pi} I(t) \sum_{\text{segmentos } i} \frac{l_i}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}|},$$

donde $\mathbf{r}_i$ es el vector que apunta al centro del segmento i. Una vez que se calcula el potencial del vector, el campo eléctrico inducido es

35
$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = -\frac{\partial \mathbf{A}(\mathbf{r}, t)}{\partial t}.$$

- 40 La precisión del cálculo numérico se analizó para bobinas circulares idealizadas en comparación con la solución analítica [3]. La discretización en segmentos de 1 milímetro fue suficiente para reproducir la solución analítica con menos del 0,01 % de error en la intensidad del campo eléctrico, evaluada a 1 cm de la superficie de la bobina. También se compararon las simulaciones que utilizan devanados en espiral, ya que aparecen en la realidad para simulaciones en las que los devanados interiores eran copias a escala del devanado exterior. La única diferencia apareció al comienzo y al final de cada devanado. Como el comienzo y el final de los alambres de la bobina de hoja de trébol están localizados lejos del centro de la bobina, las pequeñas desviaciones no son relevantes para las simulaciones y se utilizó el escalado para reproducir la forma de los bucles internos (véase también la figura 13).

Umbral de excitación neuronal

- 45 Para juzgar la eficacia de la estimulación de la bobina de hoja de trébol se estimó el umbral de excitación esperado para varias orientaciones entre la bobina y la neurita. Utilizando el campo eléctrico E inducido por la bobina de hoja de trébol 3 cm por encima de su centro, se calculó el efecto del sobre el potencial de membrana V de un cable pasivo (1 μ m de diámetro, 1 mm de longitud) como se describió anteriormente (Rotem and Moses 2008), utilizando la ecuación de cable con un término fuente que representa el campo E:

$$\lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial l^2} - \tau \frac{\partial V}{\partial t} - V = \lambda^2 \frac{\partial E_l}{\partial l}.$$

Se eligieron la constante de longitud axial $\lambda = 384 \mu\text{m}$ y la constante de tiempo $\tau = 300 \mu\text{s}$ para aproximarse a las condiciones de un axón no mielinizado (Rotem and Moses, 2008), el eje l corre paralelo al cable y E_l es la proyección de E en esta dirección. Se supone que los extremos del cable están sellados, lo que implica las condiciones de contorno:

$$\frac{\partial V(0,t)}{\partial l} = \frac{\partial V(L,t)}{\partial l} = 0.$$

$$I_i = \frac{1}{r_i} \frac{\partial E_l}{\partial l}$$

Utilizando la resistencia axial r_i , el término fuente es equivalente a una inyección de corriente con signos opuestos en los dos extremos. Para realizar la simulación, se utilizó el método IClamp del entorno de simulación NEURON. Para cada ángulo entre el eje x y la neurita, se calculó el campo inducido para una cierta corriente de bobina máxima y, por lo tanto, una cierta amplitud máxima de los componentes x e y de E (E_x^{max} y E_y^{max}). A continuación, se utilizó la proyección E_l para calcular el curso de tiempo resultante del potencial de membrana. Se repitió el cálculo variando E_x^{max} y E_y^{max} en una búsqueda binaria, para encontrar el valor en el cual la membrana se despolarizó en solo 30 mV, criterio seguido para una excitación satisfactoria. La variación sistemática del ángulo y de la corriente de la bobina, así como la comunicación de la inyección de corriente respectiva I_i con NEURON se automatizaron utilizando Python.

Medidas del campo magnético giratorio

Se midió el campo eléctrico utilizando una bobina circular colocada en el plano de las bobinas cruzadas. Se llevó a cabo la medida tanto para la bobina cruzada ensamblada, con la sonda girada 90 grados entre medidas, como para cada una de las bobinas por separado. Los campos resultantes se muestran en la Figura 1, donde el cambio de fase es obvio, y se muestra también la suma resultante de los dos vectores. El campo eléctrico total resultante realiza una rotación, barriendo aproximadamente 270° en los tres cuartos de un ciclo, lo que es del orden de $300 \mu\text{s}$. Su magnitud, representada por el radio del vector giratorio en la Figura 1e, se mantiene prácticamente constante durante el primer cuarto de rotación, en un valor comparable a la intensidad máxima obtenida con una sola bobina, del orden de 300 V/m .

Excitación de cultivos neuronales 2D

El principal resultado de utilizar las bobinas cruzadas se puede ver inmediatamente mirando a los cultivos bidimensionales (2D). Aunque previamente la excitación de los cultivos 2D con pulsos magnéticos había sido insatisfactoria, en las bobinas cruzadas esto se logró fácilmente. Como se muestra en la Figura 8, la mitad de los cultivos 2D analizados (15 de $N = 30$) fueron excitados por la estimulación magnética. Sorprendentemente, con esta geometría aproximadamente el 25 % ($N = 4$) de los cultivos 2D que respondieron a las bobinas cruzadas respondieron también a la excitación cuando se utilizó solo una única bobina del sistema de bobina cruzada, con un campo umbral que fue similar o 15 % más fuerte que el de la bobina cruzada. El umbral del campo eléctrico estimado para la excitación se distribuyó alrededor de una media de 360 ± 40 (SD) V/m y estuvo de acuerdo con lo informado previamente para los cultivos 1D (300 ± 130 (SD) V/m).

Una prueba para la direccionalidad se encuentra en dos cultivos que fueron excitados tanto por una única bobina como por la bobina cruzada. Girando físicamente el cultivo 45° con respecto a la bobina, se podría comprobar si la orientación aleatoria inicial era dominante en hacer posible la excitación. La estimulación de la bobina única fue realmente sensible a esta rotación, con el umbral escalando más allá de la máxima intensidad de campo de este sistema. Sorprendentemente, la estimulación con la bobina cruzada no demostró ninguna sensibilidad a la rotación, y el cultivo respondió en todos los ángulos.

Preparación de cultivo primario. Para analizar el efecto de los nuevos estimuladores, se aplicaron los estimuladores por primera vez a cultivos bidimensionales. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Weizmann Ethics Committee (IACUC). Los cultivos se prepararon a partir de hipocampo disociado de ratas prenatales siguiendo un protocolo previo (M. Papa, M. C. Bundman, V. Greenberger, M. Segal, J Neurosci 15, 1 (Jan, 1995)). Las células se extendieron en cubreobjetos de vidrio de 30 mm # 0 (Menzel-Glaser, Alemania), a una densidad de 3 millones de células por cubreobjetos.

Estimulación magnética trans-vasos (TvMS) de cultivo primario. Para medir la respuesta de los cultivos a la estimulación magnética, se tiñeron los cultivos con colorante fluorescente sensible al calcio y se obtuvieron imágenes de transitorios de calcio (A. Rotem, E. Moses, Biophys J. 94, 5065 (Jun, 2008) incorporado aquí en su

totalidad como referencia) mientras que se aplicaban pulsos magnéticos a los cultivos. El posicionamiento de las bobinas con respecto al cultivo fue diferente entre los dos grupos de bobinas.

En el caso de las bobinas cruzadas (figura 1c), se colocó el cultivo en una bola de vidrio casi esférica, de aproximadamente 60 mm de diámetro, cuyo fondo se aplanó para crear una base circular de aproximadamente 30 mm de diámetro sobre la que se pone el cubreobjetos. En la parte superior de la esfera se abrió una ranura a través de la cual se podía insertar el cubreobjetos y en la base de la esfera se hizo un orificio de observación de 13 mm de diámetro cerca de la circunferencia de la base, cubierto con un cubreobjetos de vidrio ópticamente transparente. La esfera de vidrio se colocó dentro de las bobinas cruzadas, con la base aplanada colocada sobre uno de los polos (véase la figura 1c) y se colocó un microscopio invertido debajo del orificio de observación.

En el caso de la bobina de hoja de trébol, se colocó el cultivo 5 mm por debajo del centro de la bobina y paralelo a su plano. Se puso un microscopio invertido debajo del cultivo.

Estimulación magnética transcraneal de ratas anestesiadas. Para evaluar adicionalmente el poder de excitación de los nuevos estimuladores magnéticos, se comprobó su efecto sobre ratas adultas anestesiadas con ketamina y xilazina. Se ha demostrado en ratas que la ketamina en combinación con la xilazina da como resultado suficiente anestesia y analgesia sin deprimir las funciones vitales (para referencia, véase S. Zandieh, R. Hopf, H. Redl, MG Schlag, Spinal Cord 41, 16 (Jan, 2003) Todos los procedimientos fueron aprobados por el Weizmann Ethics Committee (IACUC). Antes de los experimentos, se anestesiaron las ratas usando ketamina a 75 mg/kg (Kepro, Holanda) y xilazina a 7,5 mg/kg (Kepro, Holanda) inyectadas IP. Se anestesiaron las ratas aproximadamente 1 hora antes del comienzo del experimento y, de ahí después, se inyectó ketamina IP durante todo el experimento a una velocidad media de 75 mg/kg/h según el nivel de anestesia del animal. Al final del experimento, se sacrificaron las ratas utilizando 150 mg/kg de pentobarbital sódico (CTS, Israel).

Durante los protocolos de TMS, se colocaron las ratas de modo que su corteza motora estuviera en el foco de la estimulación: en el caso de las bobinas cruzadas, se puso la cabeza de las ratas dentro de las dos bobinas, con la corteza motora localizada justo debajo de uno de los polos. En el caso de la bobina de hoja de trébol, se puso el centro de la bobina justo encima de la corteza motora.

Para monitorizar el efecto de la TMS en la rata, se registraron de sus patas traseras los potenciales musculares inducidos utilizando un sistema EMG. Se midió el umbral de estimulación, es decir, el campo magnético mínimo requerido para crear una respuesta tal como se registra en el EMG.

Excitación de la corteza motora de la rata

La configuración de bobina cruzada es particularmente adecuada para aplicación en las ratas, ya que la cabeza del animal encaja bien dentro de la bobina cruzada, con la corteza colocada sobre el eje de articulación de las dos bobinas (su diámetro compartido, véase la figura 1f), donde el campo es máximo. Se probaron 9 animales para la respuesta del músculo gastrocnemio a la estimulación magnética, medida por un electrodo de electromiograma (EMG) en la pata del animal. La principal dificultad en esta prueba es diferenciar entre la excitación de la corteza motora y la de la médula espinal. Esto se hizo utilizando las diferentes latencias de la respuesta en los dos modos de excitación.

Como se muestra en la Figura 2d, la respuesta del músculo gastrocnemio a la estimulación fue compleja pero reproducible. Se observaron dos tiempos de latencia típicos, que se asociaron con la respuesta medular ($3,2 \pm 0,2$ ms (SE)) y con la respuesta cortical ($7,4 \pm 0,4$ ms (SE)). En la mayoría de los casos, las respuestas medular y cortical se pueden diferenciar de manera fiable por el tiempo de latencia. La dislocación cervical o el corte de la médula espinal abolieron la respuesta de latencia más larga, mientras que la más corta permaneció activa durante varios minutos. La respuesta medular fue típicamente excitada a un umbral de estimulación magnética más bajo que el de la cortical.

En ocho de los nueve animales analizados, se observó una clara respuesta de la corteza motora a la estimulación de la bobina cruzada. Cuatro de estos animales respondieron también a la estimulación utilizando solo una única bobina del sistema de bobinas cruzadas. Como en las estimulaciones de cultivos neuronales, cuando se usa solo una única bobina, el umbral del campo eléctrico fue siempre igual o más alto que el del sistema de doble bobina (entre 0 % y 33 % más alto, 10 % de media). El umbral del campo eléctrico estimado para la excitación se distribuyó alrededor de una media de 250 ± 10 (SD) V/m.

Se evaluó la dependencia de las respuestas corticales de la orientación utilizando la bobina cruzada. Con el campo giratorio, no se observó ninguna dependencia y se midió la misma respuesta en todas las orientaciones relativas entre la bobina y el animal, por lo que el posicionamiento de la rata no fue un parámetro crítico del experimento. En cambio, el uso de una única bobina necesitó una posición precisa de la cabeza de la rata dentro de la bobina para asegurar la estimulación efectiva de la respuesta cortical. Por otro lado, no hubo ninguna diferencia discernible en el umbral necesario para la excitación cortical con una sola bobina ni con la bobina cruzada, una vez que se determinó la orientación óptima para la excitación con bobina única. Se hicieron varios intentos para estimular la corteza con una bobina circular simple como se describe más adelante en la presente memoria, pero no se logró una excitación clara.

Se observó un aumento del 50 % en los umbrales de excitación inmediatamente después de las inyecciones de anestesia con xilazina, los cuales disminuyeron a los valores de la línea base después de 1 hora. Las inyecciones de anestesia con ketamina no afectaron a los umbrales medidos (se pueden encontrar más detalles más adelante en la presente memoria).

- 5 Estimulación eléctrica de cultivo primario unidimensional. Para comparar la respuesta de los cultivos a diferentes duraciones de estimulación, se estimularon eléctricamente cultivos unidimensionales. Estos cultivos fueron modelados en líneas rectas de 200 μm de espesor y 8 mm de largo en cubreobjetos de vidrio de 13 mm utilizando un protocolo desarrollado en el laboratorio. Los detalles se pueden encontrar en O. Feinerman, E. Moses, J. Neurosci Methods 127, 75 (Jul 15, 2003) totalmente incorporados a esta memoria como referencia. La estimulación se logró utilizando electrodos de baño hechos de 2 alambres de platino paralelos (0,127 mm (0,005 in) de espesor, A-M Systems USA) de 2 cm de largo y 3 cm de separación que se sumergieron en la placa de registro. Para la estimulación, se utilizó un pulso cuadrado bipolar, que duraba entre 0,1-10 ms con amplitudes de 1-36 V pico a pico.

Resultados

Medidas de estimulaciones de campo giratorio

- 15 La Figura 1e muestra el campo eléctrico resultante de un prototipo de bobina cruzada, que escanea casi todas las direcciones.

- Estimulación eléctrica de cultivo unidimensional. Los fundamentos que hay detrás de la idea de la excitación axonal frente a la dendrítica se pueden probar utilizando la estimulación directa de electrodos de baño, ya que la duración del pulso eléctrico se puede controlar fácilmente (en contraste con el pulso magnético). La duración de la inyección de corriente por los electrodos se puede variar fácilmente de 100 μs a 10 ms. La Figura 16 muestra dos ejemplos de cultivos. Como se muestra en la figura 16a el primero se excita ya con el pulso de 100 μs , lo que indica que hay suficientes axones en el cultivo que son paralelos al campo eléctrico entre los electrodos y ellos excitan al resto de la red. El segundo ejemplo es un cultivo que no responde a 100 μs , sino que necesita un pulso de algunos ms para responder. Aquí solo se espera que tenga lugar la excitación dendrítica. De hecho, como se predijo, la figura 14b muestra que el primer cultivo depende en gran medida de la orientación, y que la amplitud necesaria para la excitación cuando el campo es paralelo al cultivo (y a los axones) es mucho más baja que la necesaria para la excitación cuando el campo está en ángulo con los axones. Por otro lado, el cultivo que responde por excitación dendrítica no tiene ninguna dependencia observable de la orientación del cultivo con respecto al campo eléctrico. Este resultado refuerza considerablemente el entendimiento de que los dos modos de excitación - dendrítica frente a axonal - pueden desempeñar un papel muy diferente y crucial en la iniciación de la actividad en el cultivo.

- Estimulación magnética del cultivo primario. Se analizaron 27 cultivos de neuronas hipocampales bidimensionales extendidas sobre cubreobjetos de vidrio de 30 mm de diámetro. De estos, 13 fueron estimulados utilizando una bobina circular colocada horizontalmente encima del cultivo, 10 fueron estimulados utilizando la configuración de bobina cruzada (véase métodos), y 4 fueron estimulados utilizando ambos métodos. De los 14 cultivos que se estimularon utilizando las bobinas cruzadas, 5 respondieron al campo giratorio y solamente uno respondió también a una única bobina vertical del sistema cruzado (Figura 4). De los 17 cultivos que fueron estimulados utilizando una bobina horizontal, solamente 3 respondieron. Los 4 cultivos que se estimularon con ambos métodos respondieron al campo giratorio, mientras que solo uno de estos cultivos respondió a la bobina horizontal. El umbral estimulante en ambos métodos fue similar, con una media de $460 \pm 40 \text{ V/m}$. Este umbral es $\sim 50 \%$ más alto que el umbral medido para cultivos unidimensionales, mientras que la tasa de éxito de la bobina cruzada (36 %) es $\sim 50 \%$ más baja que la de los cultivos unidimensionales [Rotem & Moses Biophys J. 2008]. Los resultados se resumen en la figura 8.

Ejemplo 2

Excitación eléctrica frente a excitación magnética de los cultivos neuronales

- Según este aspecto y en una realización, se analiza la estimulación eléctrica para llegar a comprender la estimulación magnética. Debido a que los pulsos largos ($\sim 1 \text{ ms}$) son fáciles para excitar eléctricamente pero no magnéticamente, y puesto que los mecanismos fundamentales detrás de los dos modos de simulación son similares, se investigó la respuesta de los cultivos a la duración variable de los pulsos eléctricos. En base a esto, se sacaron conclusiones razonables y se hicieron conjeturas sobre el mecanismo que subyace en la estimulación magnética.

- Para demostrar la dependencia del tiempo, se analizaron cultivos que se pueden estimular tanto eléctricamente como magnéticamente, y se compararon con aquellos que sólo se pueden excitar eléctricamente. Naturalmente resulta que los cultivos que responden al imán responden a pulsos eléctricos cortos. Lo que no es obvio es que los cultivos que no responden a la estimulación magnética tampoco responden a los pulsos cortos, y pueden ser excitados sólo con pulsos eléctricos largos.

Métodos:

- 55 Estimulador eléctrico

El cultivo neuronal, que se hace crecer sobre un cubreobjetos circular, se colocó en el centro de una placa de registro como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Un marco de teflón anular hecho a medida se encajó en la placa de la muestra y podía girar libremente sobre el cultivo. Se montaron dos alambres de platino paralelos (0,127 mm (0,005 in) de espesor, A-M Systems USA) de 20 mm de largo y 12,5 mm de separación a lo largo del fondo del marco aproximadamente 1 mm por encima del cultivo y se sumergieron en el medio de registro.

Los alambres se conectaron a un estimulador alimentado por batería hecho a medida disparado a través de un fotoacoplador para aislar la muestra de cualquier ruido eléctrico que se origine en la red eléctrica. Para la estimulación, se utilizó un pulso cuadrado bipolar, con una duración variable que variaba entre 0,01-10 ms y con amplitudes de 1-36 V pico a pico. El disparo y la duración del pulso se controlaron con precisión mediante un generador de señales (DS345 Synthesized Function Generator Stanford Research Systems Sunnyvale, California, USA).

Cultivos neuronales

Se utilizó una variedad de protocolos experimentales para obtener cultivos para diferentes aspectos del experimento. Se utilizaron geometrías de cultivos tanto bidimensionales (N = 15) como unidimensionales modelados (N = 98). Se tomaron neuronas del hipocampo y de la corteza de la rata y del ganglio de la raíz dorsal del ratón. Todos estos tipos se utilizaron para comparar la excitabilidad eléctrica frente a la excitabilidad magnética de los cultivos. Los cultivos de hipocampo de rata modelados en líneas rectas que tenían 200 μm de espesor y 8 mm de largo sobre cubreobjetos de vidrio de 13 mm, se cultivaron de acuerdo con el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio. (Feinerman O, Segal M, Moses E. Signal Propagation along Uni-dimensional Neuronal Networks, J. Neurophysiol., 94: 3406-3416, 2005).

Medidas

Para comparar entre los dos tipos de estimulaciones, se midió la duración mínima del pulso eléctrico necesaria para estimular el cultivo y se denominó umbral de duración del pulso (DT). Se determinó el DT ajustando la corriente del estimulador a su amplitud máxima y afinando solamente la duración del pulso bipolar utilizando un algoritmo de búsqueda binaria hasta que se determina un umbral.

Resultados: N = 112 cultivos fueron analizados tanto para la excitabilidad eléctrica como para la excitabilidad magnética. Todos los cultivos respondieron a la estimulación eléctrica, aunque sólo el 16 % (N = 19) respondió a la estimulación magnética. La distribución de todos los DT se describe en la figura 10. El DT de los cultivos magnéticamente excitables tenía una media de $110 \pm 40 \mu\text{s}$ (SE) mientras que el DT medio de todos los cultivos que no respondían a la estimulación magnética era de $510 \pm 50 \mu\text{s}$ (SE).

La equivalencia de los campos eléctricos inducidos y conductivos

La ecuación del cable pasivo que describe la respuesta de las neuritas al campo eléctrico externo no depende de la fuente del campo. El campo eléctrico inducido por los pulsos de TMS es similar en intensidad al producido por los electrodos de baño. En principio, la geometría general de los campos y el movimiento de los contraiones pueden ser diferentes dependiendo de la configuración precisa de la bobina, y las condiciones límite pueden diferir. Sin embargo, a la escala de un axón que está orientado en la dirección del campo, se puede asumir que los campos son prácticamente idénticos.

Comparar el ancho de pulso efectivo de un pulso eléctrico y de un pulso magnético merece cierto cuidado. Como se muestra en la figura 1d del manuscrito, el pulso magnético sinusoidal típico de 240 μs induce un coseno para el campo eléctrico, y tiene tres fases, positiva durante aproximadamente 60 μs , negativa durante 120 μs y termina con otra etapa positiva de 60 μs . Los cambios correspondientes en el potencial de membrana son también bipolares, y producen un desplazamiento en el potencial que es máximamente positivo en una fase de $\pi/2$ y máximamente negativo en $3\pi/2$. En comparación, la figura 10a muestra el pulso eléctrico cuadrado bipolar básico que tiene dos fases, primero la fase positiva y luego la negativa. El potencial de membrana correspondiente de una terminación o curva dendrítica o axonal típica es unipolar. El potencial sube a un valor similar al del pulso magnético correspondiente, pero no cambia al signo opuesto después de relajarse a cero.

En principio, si la neurona sufre un cambio de potencial negativo o positivo debería marcar una diferencia en la respuesta de la neurona, con una mayor probabilidad de que el cambio de potencial positivo cree un potencial de acción. Sin embargo, no se encontró una dependencia obvia del orden de la polaridad, lo que indica que, para una dirección dada, los axones y las dendritas tenían la misma probabilidad de apuntar en ambas orientaciones opuestas.

También se analizó el uso de un pulso eléctrico en forma de uno inducido magnéticamente, con un cuarto de ciclo en la dirección positiva, luego dos cuartos en la dirección opuesta, negativa y terminando con el último cuarto positiva de nuevo. Los resultados fueron similares a los del pulso original utilizado. Se ha visto que todos los cultivos que responden a duraciones de pulso más cortas que 60 μs fueron excitados también por TMS, y quizá lo más significativo, solamente esos. Esto está de acuerdo con la duración del pulso de TMS, que es 60 μs .

Los pulsos más largos excitan más cultivos

A partir de la distribución de los DT (figura 10b), se puede llegar a la conclusión de que los pulsos más largos son más eficaces en la excitación de los cultivos. Esto, junto con la equivalencia entre la estimulación magnética y eléctrica, implica que los pulsos de TMS más largos serán más eficientes en la excitación de las neuronas, con una escala de tiempo crítica de 200 μ s. Por ejemplo, se espera que un pulso de TMS que dure 500 μ s excite el 80 % de todos los cultivos.

Uso de la bobina circular convencional

Resultados en experimentos de cultivo

En un estudio anterior, los cultivos bidimensionales (2D) conectados aleatoriamente no pudieron ser estimulados magnéticamente utilizando bobinas circulares estándar, incluso en campos magnéticos altos (~ 5 T) producidos por la fuente de alimentación doméstica ([Rotem & Moses BioPhys J 2008]). Este estudio se basó en el examen de 11 cultivos. En el estudio actual, dos de los 12 cultivos que respondieron a las bobinas cruzadas respondieron también a la bobina estándar (otros 3 cultivos respondieron a la bobina estándar y no se probaron utilizando la doble bobina debido al deterioro de la muestra con el tiempo).

Una posible explicación de este fenómeno es que en estos cultivos un subconjunto de los axones está orientado en una dirección paralela al campo eléctrico inducido. Dado que el campo eléctrico se encuentra en anillos concéntricos con los bordes del cubreobjetos, se buscaron los axones que pudieran estar en esta dirección. Un ejemplo de una de tales neuronas teñidas con GFP se presenta en la figura 17. El axón de esta neurona se extiende a 3 mm y crece paralelo a los bordes del cubreobjetos. El efecto de orientación de los bordes sobre los axones ha sido demostrado previamente (Fienerman *et al.* J. Neurophys 2005). Si de hecho el borde obliga a un gran número de neuronas a tener axones orientados a lo largo de la orilla que rodea el cultivo, entonces éstos deberían ser excitados por el campo eléctrico inducido y poder iniciar la actividad en todo el cultivo.

Resultados de experimentos en ratas

Además de la excitación satisfactoria por bobina cruzada de la actividad cortical en ratas, como se ha descrito anteriormente en esta memoria, se estimularon las ratas magnéticamente utilizando la bobina circular única estándar. Aunque la excitación cervical fue evidente, no se pudo diferenciar un componente cortical en la señal. Por lo tanto, se utilizó la bobina circular principalmente para la tarea de caracterizar el efecto de los agentes anestésicos ketamina y xilazina sobre el umbral para la excitación de la actividad cervical. Se realizó un experimento utilizando las bobinas cruzadas para verificar estos resultados.

Efecto de la anestesia sobre el umbral de estimulación

En el experimento descrito en la figura 17 se realizaron una serie de 15 medidas del umbral mientras el animal estaba anestesiado y había recibido varias dosis de anestésicos, utilizando bien una combinación de ketamina y xilazina o bien ketamina sola. Como se ve en la figura, el umbral medido después de las dosis de ketamina sola difería en no más del 10 % uno de otro, mientras que la xilazina aumentaba el umbral en aproximadamente un 50 %. Dado que la precisión en la determinación del umbral es del orden del 10 %, se puede concluir que los umbrales del campo eléctrico no se deben medir cerca de la aplicación de xilazina (los tiempos de relajación que se derivaron del ajuste de los datos fueron de aproximadamente 1 hora). pero esa aplicación de ketamina no afecta al umbral más allá de la desviación estadística típica de las medidas.

El diseño de hoja de trébol

La configuración de la bobina cruzada es radicalmente diferente de las bobinas estándar que actualmente están en uso clínico. Se encontró que esta configuración es altamente eficiente en los cultivos y en las ratas, pero pueden surgir algunas complicaciones cuando se aplique a los seres humanos. En particular, la gran estructura y el posicionamiento de la cabeza dentro de la configuración de aspecto de jaula podrían desalentar a los sujetos e interferir con la tranquilidad del paciente durante el experimento. Además, los campos inducidos por las bobinas cruzadas alcanzan zonas mucho más profundas del cerebro que las bobinas estándar y pueden activar regiones o músculos no deseados durante el experimento.

Como alternativa, se describe en la presente memoria una realización de configuración de hoja de trébol. La configuración de hoja de trébol es similar a los productos convencionales actualmente disponibles. La hoja de trébol consiste en dos pares de bobinas de "forma de ocho" (Figura 13). Cada par está conectado a una fuente de alimentación independiente. Los dos pares están colocados en el mismo plano y son perpendiculares entre sí, de modo que, en el punto de acceso, sus campos eléctricos resultantes son perpendiculares. De modo similar a la configuración de la bobina cruzada, los pulsos de los pares están separados por una fase de 90 grados. El campo eléctrico resultante en el punto de acceso completa 3/4 de un círculo durante un pulso combinado. El resto de las características del campo eléctrico, en términos de fuerza, enfoque y decaimiento en el eje Z son similares a las bobinas convencionales de forma de ocho.

Una versión avanzada de la bobina de hoja de trébol es la hoja de trébol densa (Figura 13). En esta bobina, cada componente circular fue distorsionado cerca del punto de acceso para minimizar el espacio vacío por encima del punto de acceso, aumentando así la intensidad del campo en el mismo punto de acceso a la vez que se reduce el volumen del punto de acceso.

- 5 La invención se define en la reivindicación 1. Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para la excitación de las neuronas, en donde:
 - 5 dicho dispositivo comprende un conjunto de al menos dos bobinas separadas conectadas independientemente a una fuente de alimentación para suministrar energía eléctrica a dichas bobinas de tal modo que:
 - dichas bobinas están configuradas para ser accionadas independientemente,
 - dichas al menos dos bobinas separadas están configuradas para ser accionadas con desplazamiento de fases de corriente en el tiempo,
 - y dichas corrientes son pulsadas,
 - 10 dichas corrientes con desplazamiento de fases están configuradas para inducir al menos dos campos magnéticos dependientes del tiempo,
 - y
 - la suma resultante de dichos al menos dos campos magnéticos es un campo magnético giratorio.
 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde dicha fuente de alimentación comprende dos unidades de fuente de alimentación, en donde dichas dos bobinas están conectadas independientemente a dichas dos unidades de fuente de alimentación.
 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde dichas dos bobinas están en ángulo una con respecto a otra.
 4. El dispositivo de la reivindicación 3, en donde dichas dos bobinas son perpendiculares entre sí.
 5. El dispositivo de la reivindicación 4, en donde dicha diferencia de fase de dicha primera corriente con respecto a dicha segunda corriente es de 90 grados.
 6. El dispositivo de la reivindicación 5, en donde dicha diferencia de fase de 90 grados representa un retraso de 1 cuarto de ciclo de dicha primera corriente detrás de dicha segunda corriente.
 7. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde los pulsos de dicha primera corriente y de dicha segunda corriente tienen la misma frecuencia de pulso, el mismo modelo de onda, la misma amplitud de pico o combinación de ellas, en donde el número de dichos pulsos de dicha primera corriente y de dicha segunda corriente es al menos uno.
 8. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde dicho pulso de dicha primera corriente comprende una primera onda sinusoidal y dicho pulso de dicha segunda corriente comprende una segunda onda sinusoidal de tal modo que dicha segunda onda sinusoidal se retrasa un cuarto de ciclo detrás de dicha primera onda sinusoidal.
 9. El dispositivo de la reivindicación 7, en donde dicho pulso de dicha primera corriente comprende un periodo de dicha primera onda sinusoidal y dicho pulso de dicha segunda corriente comprende un periodo de dicha segunda onda sinusoidal.
 10. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además un colector o un detector para recoger o detectar una señal eléctrica de dichas neuronas.
 11. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde dicho dispositivo está configurado para ser aplicado al cerebro de un sujeto.
 12. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde dicho sistema comprende además un detector configurado para detectar la respuesta de un cultivo a la excitación neuronal.
 13. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde dicho dispositivo comprende además una unidad de detección de señales eléctricas, una unidad de formación de imágenes o una combinación de las mismas.
 14. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la duración del pulso de dichas corrientes con desplazamiento de fases varía entre 10 μ s y 10 ms, entre 1 μ s y 100 μ s, entre 100 μ s y 2000 μ s o entre 1 ms y 10 ms.

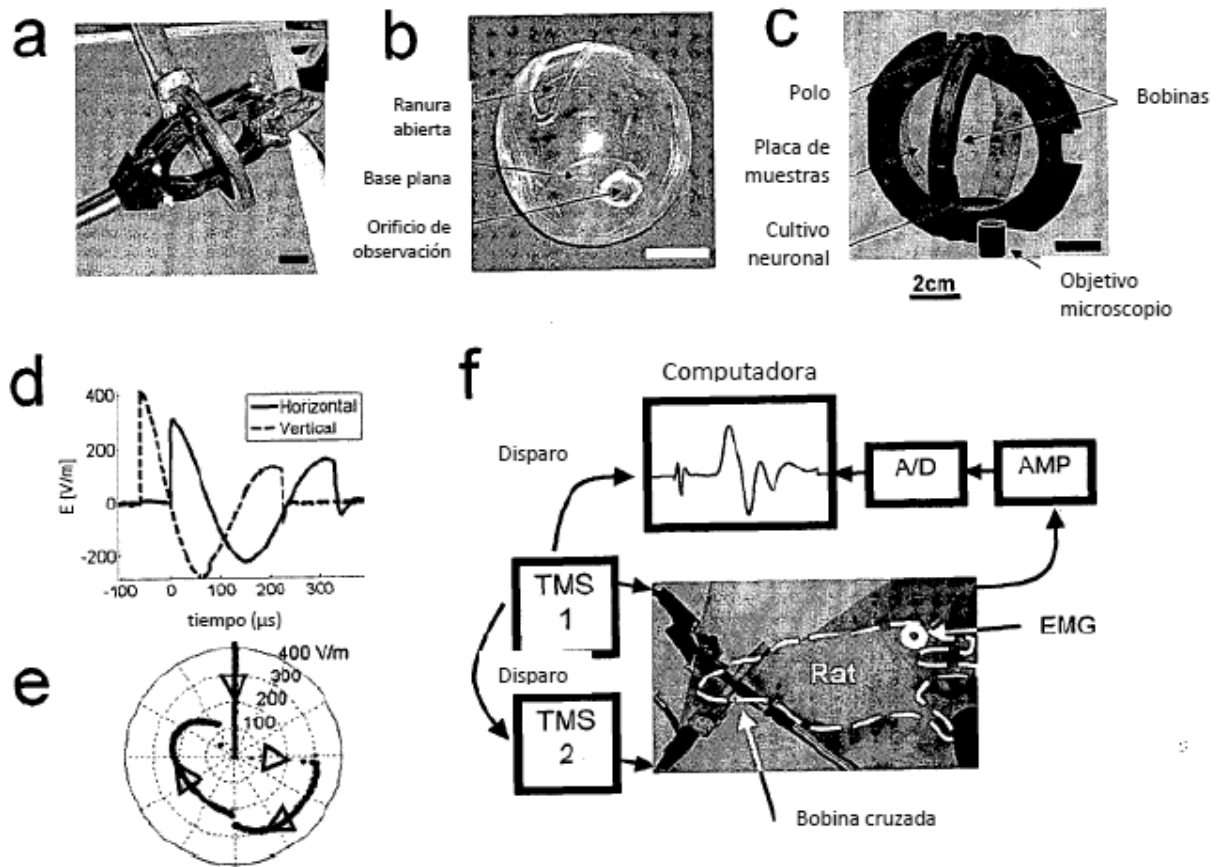


Figura 1

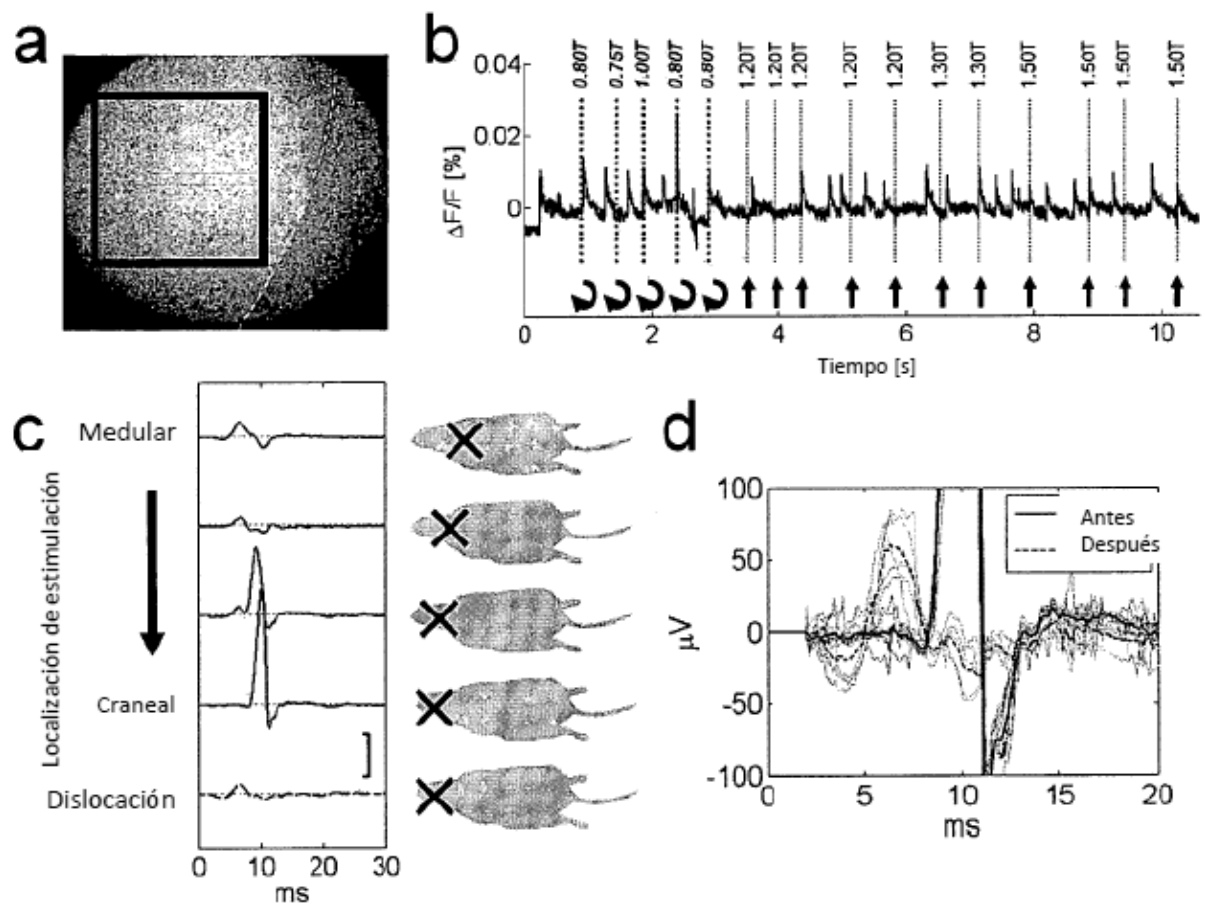


Figura 2

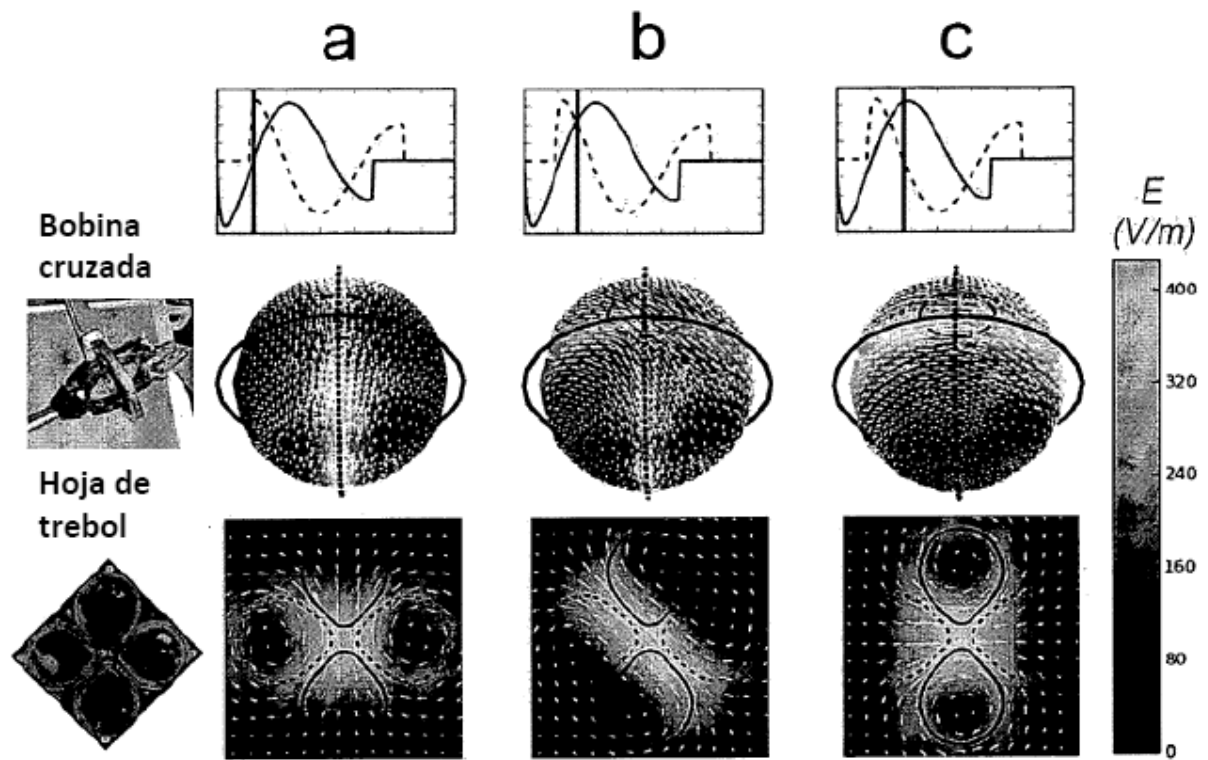


Figura 3

S.N.	Edad del cultivo (DIV)	Umbral de campo inducido (V/m)		
		Bobina horizontal única	Bobina vertical única	Bobina cruzada (campo giratorio)
1	21	en estos experimentos no se usó bobina horizontal		
2	18			
3	29			
4	18			
5	15			
6	26			
7	26			
8	11			
9	11			
10	29			440
11	15			440
12	8		510	440
13	8			400
14	23	350		360
15	20	460	en estos experimentos no se usó bobina vertical	
16	25	770		
17	16			
18	16			
19	15			
20	22			
21	15			
22	17			
23	16			
24	14			
25	NA			
26	NA			
27	NA			

Figura 4

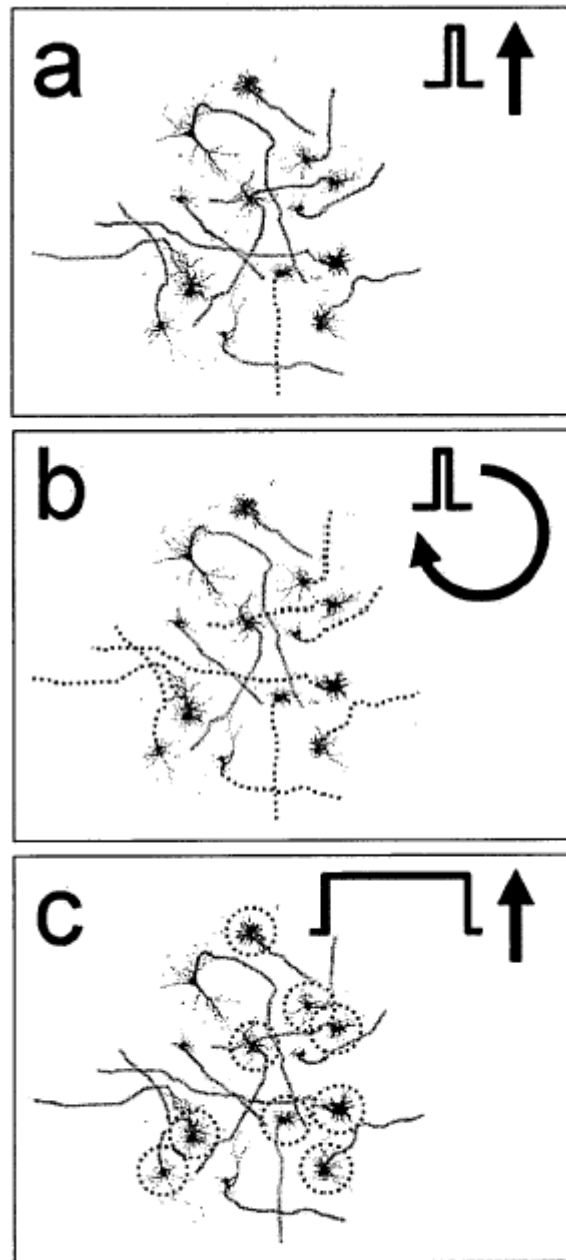


Figura 5

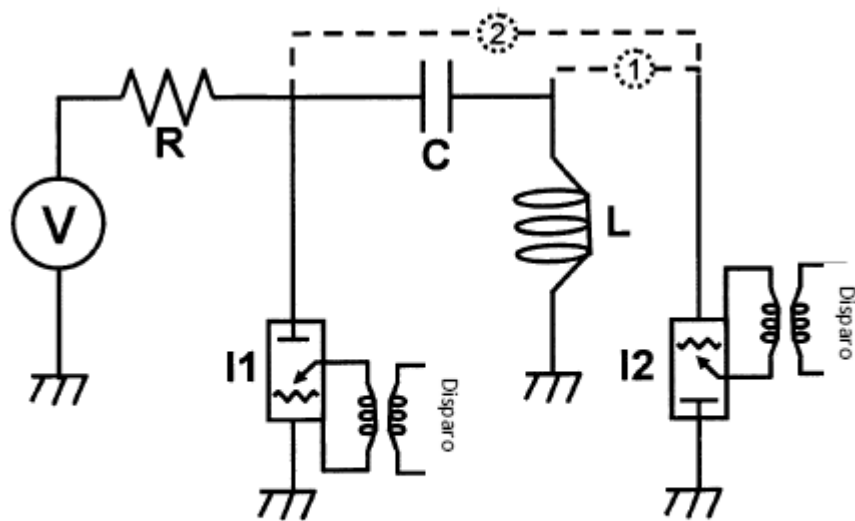


Figura 6

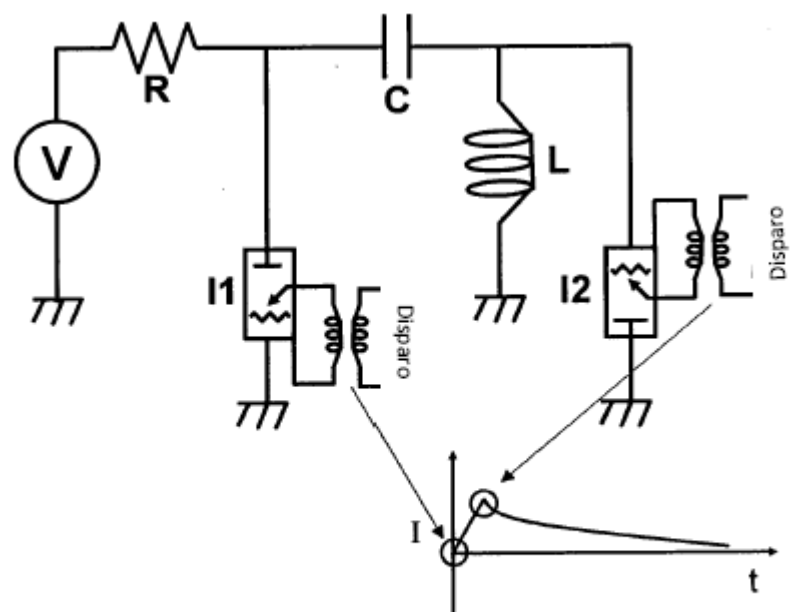
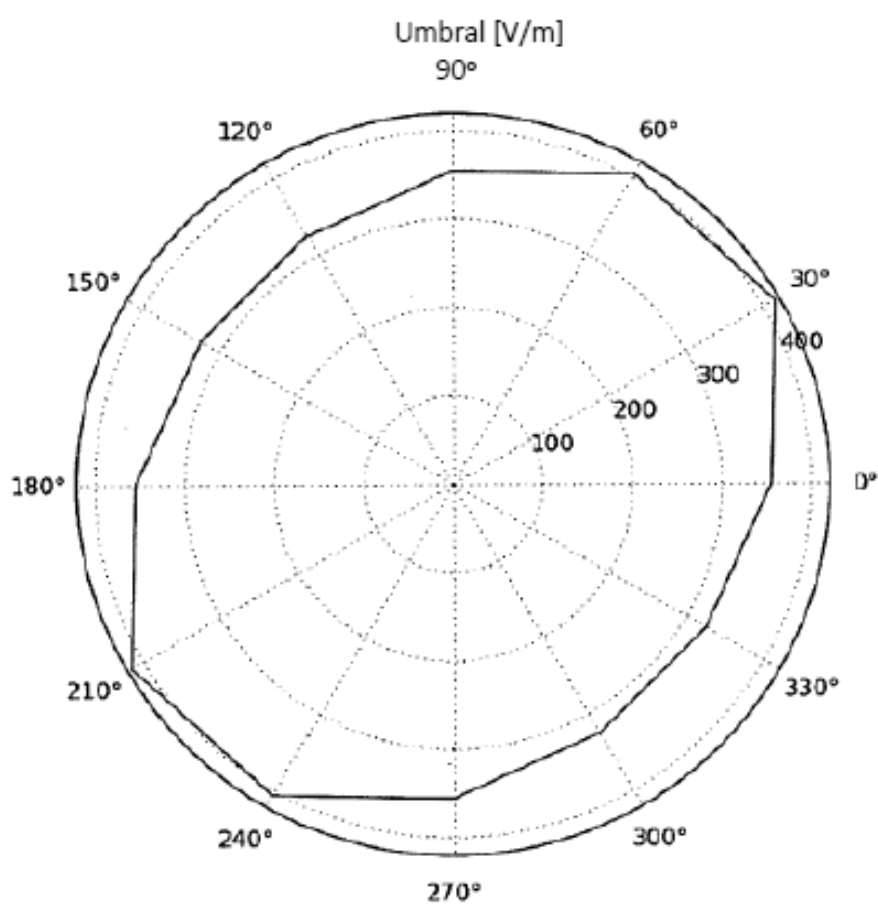


Figura 7

	Cultivo 2D		Rata	
	Respondieron a la estimulación	Umbral eléctrico	Respondieron a la estimulación	Umbral eléctrico
Bobina cruzada	50 %	360 ± 40 V/m	89 %	250 ± 10 V/m
Una sola bobina	13 %	360 ± 30 V/m	44 %	280 ± 10 V/m

Figura 8**Figura 9**

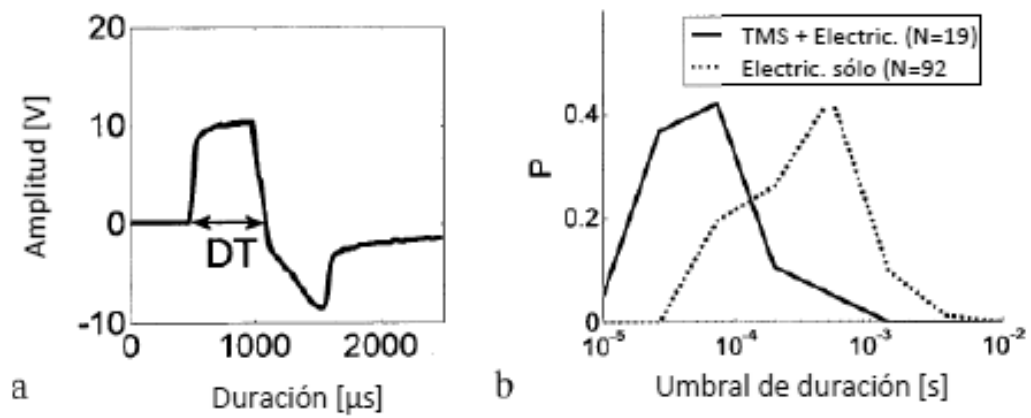


Figura 10

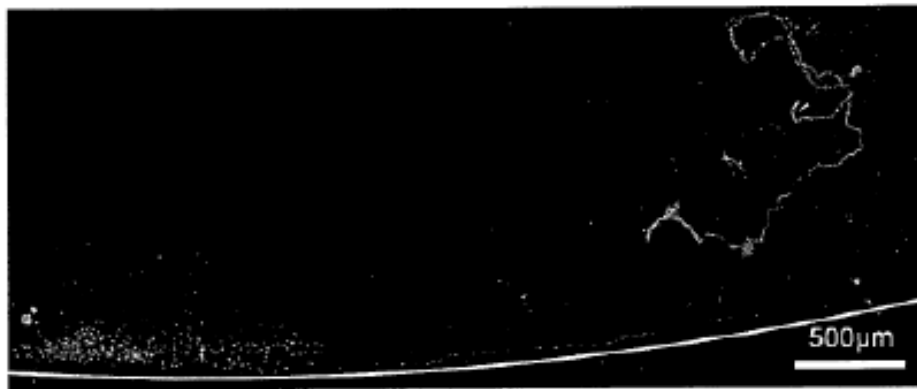


Figura 11

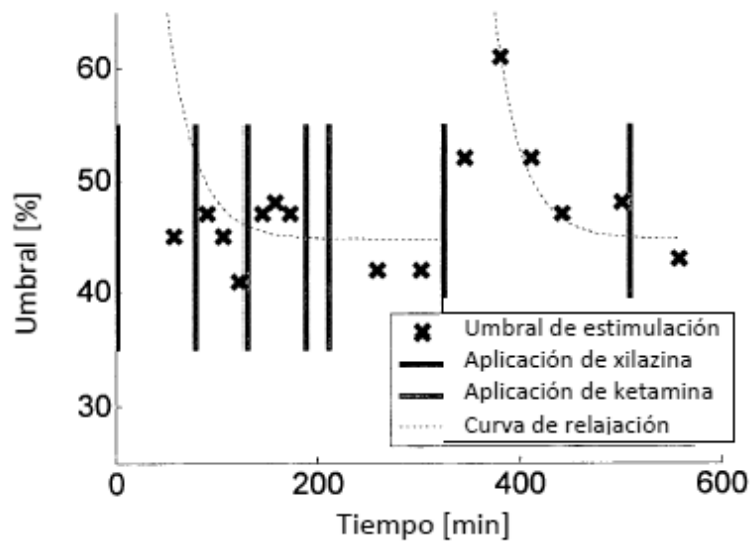


Figura 12

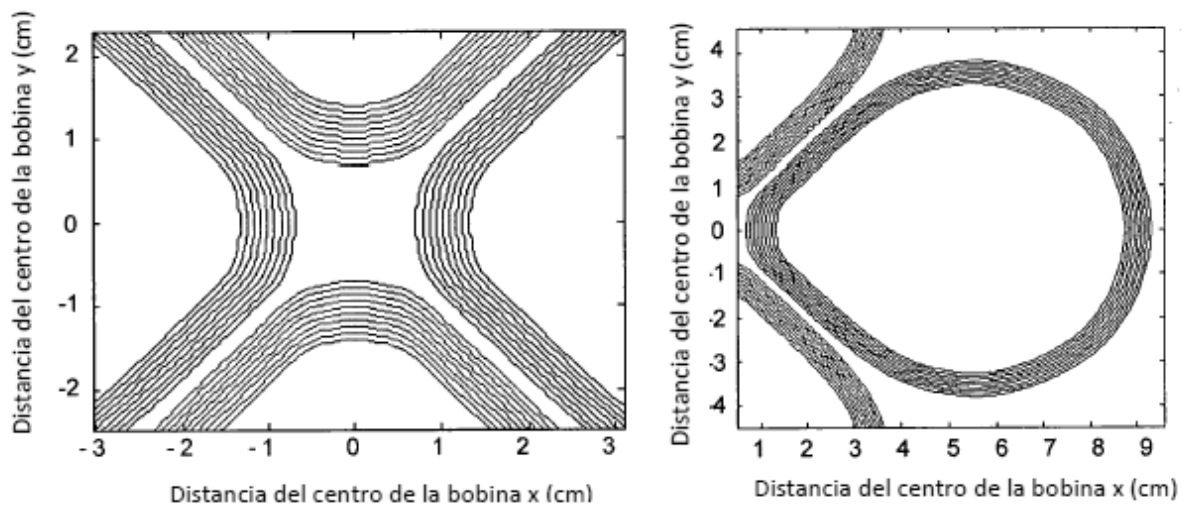


Figura 13

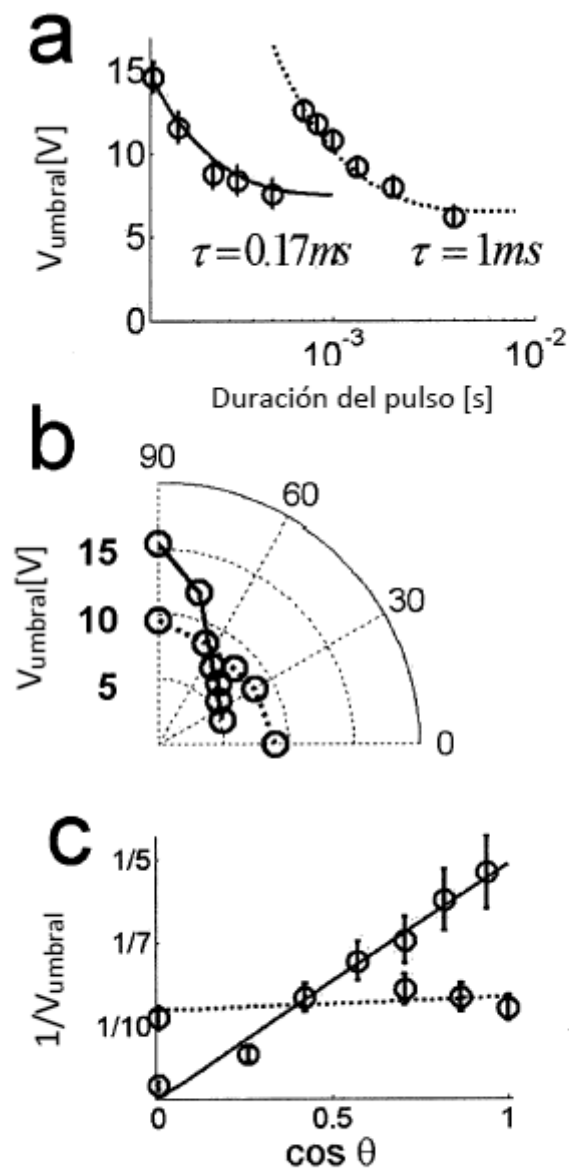


Figura 14